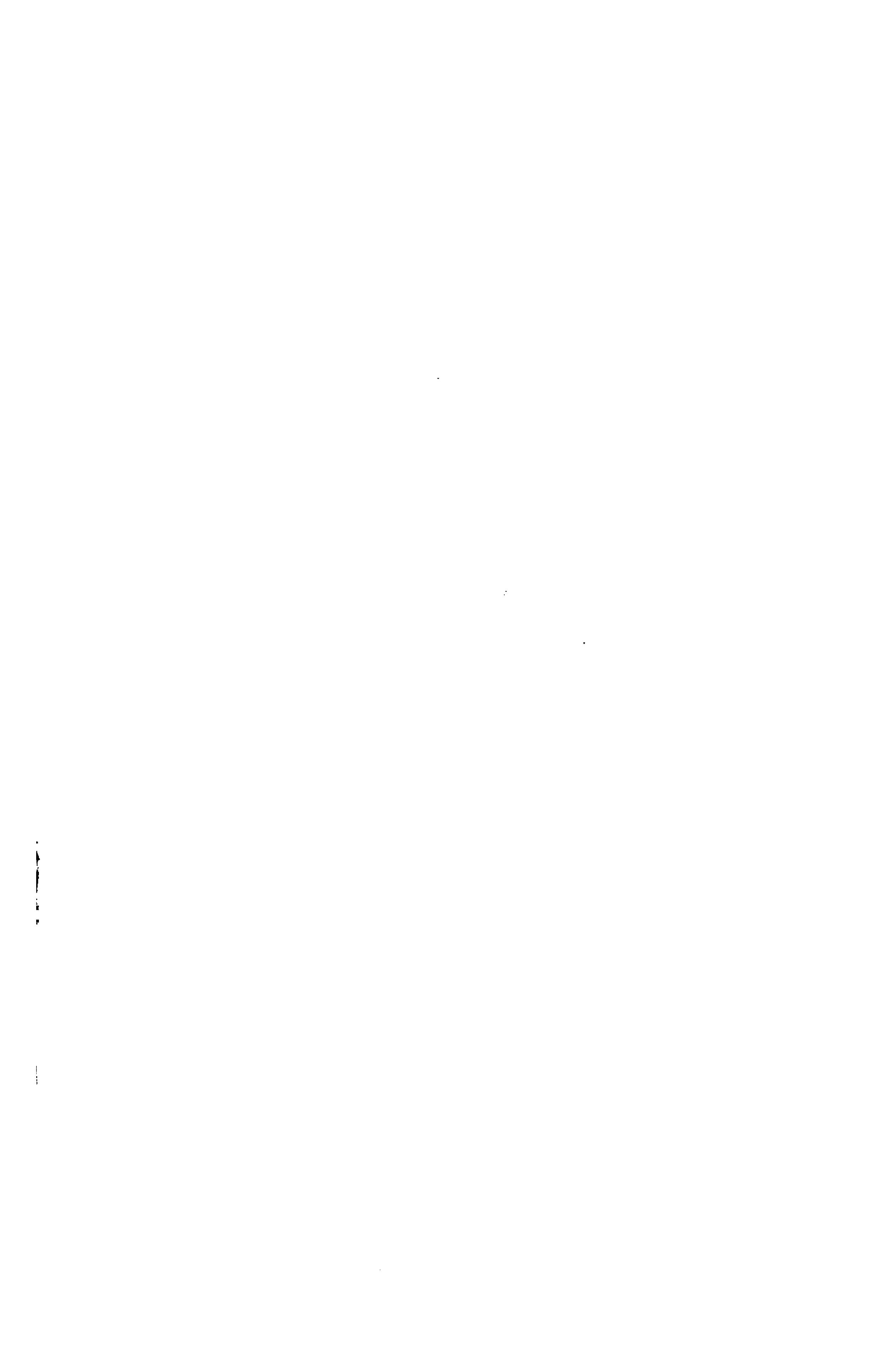
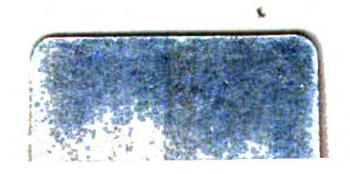










Biochemische Zeitschrift

herausgegeben von

C. Neuberg-Berlin

Hundertvierundvierzigster Band



Berlin

Verlag von Julius Springer

1924

Druck von Friedr. Vieweg & Sohn Akt.-Ges., Braunschweig.

Inhaltsverzeichnis.

Seite

Maeda, Kiyomitsu. Über die Fermente im Fruchtwasser 1
Vestlin, K. Über Blut als Saponinreagens 9
Smorodinzew, J. A. und N. P. Riabouschinsky. Zur Frage nach dem Einfluß von Arsen- und Antimonverbindungen auf die fermentativen Funktionen des Organismus. II. Mitteilung. Der Einfluß einiger Arsen- und Antimonpräparate auf das Pepsin 26
Auwers, K. v. und O. Jordan. Zur Kenntnis des Benzoyl-methyl-carbinols und des Phenyl-acetyl-carbinols 31
Neuberg, C. Zur Frage der Konstitution des biochemisch gebildeten Oxy-oxo-propyl-benzols 44
Brinkman, R. und A. v. Szent-Györgyi. Studien über die physikalisch-chemischen Grundlagen der vitalen Permeabilität. IV. Mitteilung. Die Kapillaraktivität des Sauerstoffs und der Kohlensäure an der Grenzfläche Petroläther—Wasser 47
Hara, Saburo. Über den Vitamingehalt des Brotes 52
Kerb, Johannes. Das physiologische Verhalten der Glucosane. Vorläufige Mitteilung: Zur Kenntnis der Glucosane von Johannes Kerb und Elisabeth Kerb-Etzdorf 60
Adler, A. Über fluoreszierende Oxydationsprodukte des Bilirubins und deren Bedeutung als Fehlerquelle bei dem üblichen Urobilinnachweis 64
Eichholtz, Fritz. Über die Resorption von Lecithin 66
— Über die Anwesenheit von Vitamin A in Handelslecithin 70
Behrendt, H. Über den Einfluß von Phosphat und Bicarbonat auf die Dissoziation des Kalkes im Liquor cerebrospinalis 72
Breitmann, Michael J. Über Kolloidkapillaren. Ein Beitrag zur Modelluntersuchungsmethode biologischer Erscheinungen 81
Breitmann, Michael J. und N. N. Kusnetzoff. Eine neue Methode der Bewertung der Geschwindigkeit und der Tiefe der Diffusion in Gallerten 83
Breitmann, Michael J. und N. P. Marasujeff. Zur Frage über die Ring- und Schichtungsbildung bei der Diffusion in Gallerten . . 85
Holló, J. und St. Weiss. Einfache Methode zur direkten Bestimmung der Wasserstoffzahl des Blutes mittels Indikatoren 87
Kahho, Hugo. V. Über die Einwirkung von Säuren auf die Hitzegerinnung des Pflanzenplasmas 104
Stern, Rudolf. Über den Mechanismus der serologischen Luesreaktionen. Zugleich ein Beitrag zur besseren Kennzeichnung der Eiweißfraktionen des menschlichen Blutserums 115
Noguchi, J. Über Sulfatase. IV. Mitteilung. Über die enzymatische Spaltung der β-Naphthol-schwefelsäure 138

Seite

Suganuma. Die Wirkung der Collargolblockade der Leber auf den intermediären Stoffwechsel 141
Rusznyák, Stefan. Bemerkungen über die Nephelometrie von Eiweißlösungen 147
Forrai, Elemér. Saccharophosphatase in menschlichen Organen . . . 149
Moeller, W. Die Adsorption der Aminosäuren durch tierische Gewebe 152
Berczeller, L. und H. Wastl. Über die Sedimentierung von Hefesuspensionen 159
—, —. Über Farbe und Dispersitätsgrad. II 170
Fonseca, Fernando. Über die Bestimmung des inkoagulablen Stickstoffs (Reststickstoffs) 175
Cascão de Anciães, J. H. Über die Rolle der Adsorption bei der Bestimmung des Reststickstoffs 179
Hormaeche, Estenio. Studien zur Bestimmung der Abwehrfermente 190
Takahashi, Y. Über das Vorkommen von Inulase in der Takadiastase 199
Asada, Kazuo. Der Fettstoffwechsel bei der Avitaminose. V. Mitteilung: Über die Verteilung der Fette und Lipoide in der Leber nach Phosphorvergiftung bei normalen, hungernden und avitaminösen Tieren 203
Lüers, Heinrich und Paul Lorinser. Über die Hitze- und Strahlungsinaktivierung der Malzamylase 212
Kollmann, Gustav. Zur Kritik des üblichen Verfahrens zur Ermittlung des Purinbasengehaltes von Nahrungsmitteln 219
Fischer, Anton. Über den Kohlehydratstoffwechsel von Ascaris megalocephala 224
Revoltella, Giovanni. Weiteres über die Herstellung des Ureasetrockenfermentes und über die Methodik der Harnstoffbestimmung in normalen und pathologischen Harnen 229
Händel, Marcel. Zur Frage der Acetonämie, insbesondere bei der Avitaminose 258
Jungmann, H. und M. Samter. Über den Kalkgehalt von Organen kalkbehandelter Katzen. III 265
Hecht, Gerhard. Über den Kalkgehalt von Organen kalkbehandelter Katzen. IV 270
Wha, Chienchi. Beitrag zum Verhalten von Calcium, Kalium, Chlor und Phosphor in der Milch und zur Technik der Ultrafiltration . 278
Jendrassik, L. Niveauregulator für Wasserdestillation 285
Kuroda, S. Über den Nachweis des Toluols in Organen und seine Verteilung im Organismus 287
Michaelis, Leonor und Heinrich Davidsohn. Verfahren zur Reinigung von Toxinen, Fermenten und anderen biologisch wirksamen organischen Kolloiden 294
di Renzo, Franco. Zur Kenntnis der Auxoureasen 298
Hsü, Tsou-Hia. Über die Adsorption des Trypsins durch Filtrierpapier 303
Liebesny, Paul. Die spezifisch-dynamische Eiweißwirkung 308
Heubner, Wolfgang. Die Wirkung von „Alkaloiden" auf die Permeabilität 351
Orient, Julius. Über die Wirkung der Amine auf die Gärung. II . 353
— Über die Wirkung der Oxymethylanthrachinon enthaltenden Drogen auf die Gärung 361

Seite

Pincussen, Ludwig. Fermente und Licht. IV. Diastase III von Francesco di Renzo . . . 366
— Fermente und Licht. V. Diastase IV . . . 372
Maas, Johanna. Zur Kritik der mikrochemischen Fett- und Cholesterinbestimmung nach Ivar Bang . . . 379
Hammarsten, Einar. Zur Kenntnis der biologischen Bedeutung der Nucleinsäureverbindungen . . . 383
Lüers, Heinrich und **Michael Siegert.** Zur Kenntnis der Proteine des Hafers . . . 467
Stasiak, A. Cholesterin- und Bicarbonatgehalt des Blutes im Verlaufe experimenteller Nierenerkrankungen . . . 477
Hagihara, Jitsuichi. Über den Einfluß von Kolloiden auf Fermente. III 482
Rona, P., C. van Eweyk und **M. Tennenbaum.** Über die Wirkung der Alkaloide aus der Atropin-, Cocain- und Morphingruppe auf die Hefe-Invertase . . . 490
Jendrassik, L. Humorale Übertragbarkeit von Nervenreizen beim Warmblüter . . . 520
Keeser, E. Adsorption und Arzneimittelverteilung im Organismus. III 536
Sabalitschka, Th. Über die Ernährung von Pflanzen mit Aldehyden. II. Polymerisation des Formaldehyds durch Phaseolus multiflorus und Pelargonium zu höheren Kohlehydraten. Von Th. Sabalitschka und H. Riesenberg . . . 545
— Über die Ernährung von Pflanzen mit Aldehyden. III. Stört noch vorhandener Formaldehyd die Bestimmung von Zucker und Stärke nach Sabalitschka in den mit Formaldehyd behandelten Pflanzen? Von Th. Sabalitschka und H. Riesenberg . . . 551
Engfeldt, N. O. Klinische Methode zur Bestimmung des Acetons und der β-Oxybuttersäure in kleinen Harnmengen . . . 556

Autorenverzeichnis . . . 572

Biochemische Zeitschrift

Unter Mitwirkung von

herausgegeben von

C. Neuberg-Berlin

Hundertvierundvierzigster Band

Erstes und zweites Heft

Ausgegeben am 10. Januar 1924



Berlin

Verlag von Julius Springer

1924

Die

Biochemische Zeitschrift

erscheint in zwanglosen Heften, die in kurzer Folge zur Ausgabe gelangen; je sechs Hefte bilden einen Band im Umfange von 36—40 Bogen.

In der Regel können Originalarbeiten nur Aufnahme finden, wenn sie nicht mehr als 1½ Druckbogen umfassen. Sie werden mit dem Datum des Eingangs versehen und der Reihe nach veröffentlicht, sofern die Verfasser die Korrekturen rechtzeitig erledigen. — Mitteilungen polemischen Inhalts werden nur dann zugelassen, wenn sie eine tatsächliche Richtigstellung enthalten und höchstens zwei Druckseiten einnehmen.

Manuskriptsendungen sind an den Herausgeber,

Herrn Prof. Dr. C. Neuberg, Berlin-Dahlem, Hittorfstr. 18,

zu richten.

Die Verfasser erhalten bis 100 Sonderabdrucke ihrer Abhandlungen kostenfrei bis zu einem Umfang von 1½ Druckbogen, von größeren Arbeiten nur bis 75. Doch bittet der Verlag, nur die zur tatsächlichen Verwendung benötigten Exemplare zu bestellen. Über die Freiexemplare hinaus bestellte Sonderdrucke werden berechnet. Die Herren Mitarbeiter werden jedoch in ihrem eigenen Interesse dringend gebeten, sich, wenn irgend möglich, mit der kostenfrei zur Verfügung gestellten Anzahl zu begnügen, und falls mehr Exemplare unbedingt erforderlich sind, deren Kosten vorher vom Verlage zu erfragen, um unliebsame Überraschungen zu vermeiden.

Verlagsbuchhandlung Julius Springer

Berlin W 9, Linkstraße 23/24.

144. Band. **Inhaltsverzeichnis.** Heft 1/2.

Seite

Maeda, Kiyomitsu. Über die Fermente im Fruchtwasser 1

Vestlin, K. Über Blut als Saponinreagens 9

Smorodinzew, J. A. und **Riabouschinsky, N. P.** Zur Frage nach dem Einfluß von Arsen- und Antimonverbindungen auf die fermentativen Funktionen des Organismus. II. Mitteilung. Der Einfluß einiger Arsen- und Antimonpräparate auf das Pepsin 26

Auwers, K. v. und **Jordan, O.** Zur Kenntnis des Benzoyl-methyl-carbinols und des Phenyl-acetyl-carbinols 31

Neuberg, C. Zur Frage der Konstitution des biochemisch gebildeten Oxy-oxo-propyl-benzols 44

Fortsetzung des Inhaltsverzeichnisses siehe III. Umschlagseite

Über die Fermente im Fruchtwasser.

Von

Kiyomitsu Maeda (Tokio, Japan).

(Aus der chemischen Abteilung des Rudolf-Virchow-Krankenhauses zu Berlin.)

(Eingegangen am 17. Oktober 1923.)

In der gesamten Literatur existiert über diesen Gegenstand nur eine Untersuchung, und zwar von *J. Bondi*[1]). Sie war von ihm in der Absicht unternommen worden, eine Erklärung für die mitunter rapide verlaufende Mazeration der Föten zu finden. In erster Reihe war sie also darauf gerichtet, proteolytische Fermente im Fruchtwasser nachzuweisen, und wurde dann auch ausgedehnt auf koagulierende, saccharifizierende, lipolytische und oxydative Fermente. Diese Untersuchungen liegen nunmehr 20 Jahre zurück. Da inzwischen die Fermentmethodik eine wesentliche Verbesserung erfahren hat, erschien es aussichtsvoll, den Fermentgehalt des Fruchtwassers erneut zu kontrollieren und dabei einige nicht gut verständliche Resultate in *Bondis* Untersuchungen mit neuen Methoden nachzuprüfen.

Das Fruchtwasser, das wir für unsere Versuche verwandten, war das Vorwasser, das unter bestimmten Kautelen durch künstlichen Blasensprung mit Hilfe einer Punktionsnadel entnommen war. Es stammte von Schwangeren der geburtshilflichen Abteilung des Rudolf-Virchow-Krankenhauses, und wir möchten dem Direktor derselben, Herrn Prof. Dr. *Stickel*, unseren besten Dank für sein freundliches Entgegenkommen sagen.

Zunächst prüften wir die *Reaktion des Fruchtwassers*, um festzustellen, ob sich wesentliche Unterschiede hierin mit dem Blute erkennen lassen.

Wir bedienten uns hierfür der exakten Methodik der Messung der Wasserstoffionenkonzentration mit Hilfe der von *Michaelis*[2]) angegebenen Indikatorenmethode. Da das Fruchtwasser meist sehr trübe

[1]) *J. Bondi*, Centralbl. f. Gynäkol. 1903, Nr. 21.

[2]) *L. Michaelis*, Deutsch. med. Wochenschr. 1916.

war, haben wir es vor der Verwendung stets durch ein dichtes Tuch koliert, bisweilen auch zentrifugiert und dann untersucht. Irgendwelche Schwierigkeiten ergaben sich dann nicht mehr bei der Ablesung der Resultate. Die von uns ermittelten Werte schwankten zwischen $p_H = 7{,}5$ bis 7,7. Dieser schwach alkalische Wert entspricht etwa der Wasserstoffionenkonzentration vom Serum. Wir beobachteten dabei, daß Beimengung von Mekonium den Wert etwas mehr nach dem Neutralpunkt verschiebt; offenbar beruht das darauf, daß im Mekonium geringe Mengen Fettsäure enthalten sind.

Hiernach wandten wir uns der Untersuchung auf Fermente zu und prüften zunächst das Fruchtwasser auf seinen Gehalt an:

1. Diastase.

Als Methode diente uns das Reihenverfahren von *Wohlgemuth*[1]), das sehr bequem eine quantitative Bestimmung der Diastase gestattet.

Wir verwandten hierfür die 24stündige Methode und erhielten folgende Resultate.

Tabelle I.

Versuch	$D^{38^0}_{24\,h}$	Versuch	$D^{38^0}_{24\,h}$
1	80	6	160
2	20	7	80
3	160	8	160
4	80	9	80
5	160	10	80

Wir sehen, daß die Werte für Diastasen beträchtlichen Schwankungen unterliegen. Der höchste Wert, dem wir begegneten, betrug 320, der niedrigste 20. Wenn wir nun diese Werte in Vergleich setzen zu dem Diastasegehalt des mütterlichen Blutes, so sehen wir einen großen Unterschied. Der Wert für mütterliches Blut schwankt zwischen $D^{38^0}_{24\,h} = 20$ bis 40, er liegt also weit unter dem Durchschnittswert für das Fruchtwasser. Noch viel geringer ist der Gehalt des fötalen Blutes an Diastase. Wir haben mehrfach gleichzeitig das Blut der Mutter aus der Armvene und das Blut aus der Nabelschnur, das unmittelbar nach der Durchtrennung derselben gewonnen war, auf den Diastasegehalt untersucht und mußten, da das letztere arm an Diastase war, mit 1prom. Stärkelösung arbeiten. Die erhaltenen Werte haben wir dann wieder auf 1proz. Stärkelösung umgerechnet. Als Belege geben wir ein paar Resultate nachstehend wieder.

Tabelle II.

Placentablut $D^{38^0}_{24\,h}$	Mütterliches Blut $D^{38^0}_{24\,h}$	Placentablut $D^{38^0}_{24\,h}$	Mütterliches Blut $D^{38^0}_{24\,h}$
0,4	20	0,0	20
6,4	40	0,0	20

[1]) *J. Wohlgemuth*, diese Zeitschr. 9, 1, 1908.

Hiernach ergibt sich, was auch schon *Bial*[1]) und *Bondi* festgestellt hatten, daß das fötale Blut äußerst arm an Diastase gegenüber dem mütterlichen Blute ist. Bei diesem geringen Gehalt und bisweilen sogar gänzlichen Fehlen der Diastase im fötalen Blute ist man gezwungen anzunehmen, daß die Diastase im Fruchtwasser fast ausschließlich aus dem mütterlichen Blute stammt. Zu demselben Resultate waren auch *Wohlgemuth* und *Massone*[2]) gekommen auf Grund folgender interessanter Experimente. Sie bestimmten an schwangeren Kaninchen zunächst den Diastasegehalt des Serums und exstirpierten ein Uterushorn mitsamt der Föten und bestimmten den Diastasegehalt im Fruchtwasser dieser Föten. Dann unterbanden und durchschnitten sie den Pankreasgang und töteten die im anderen Uterushorn befindlichen Föten durch Injektion von Sublimat in die Schädelhöhle ab, um eine Mitwirkung der Föten bei der Abgabe von Diastase auszuschließen. Die Unterbindung des Pankreasganges bezweckte, das Pankreassekret zu zwingen, seinen Weg durch das Blut zu nehmen und auf diese Weise den Diastasegehalt im Blute stark anzureichern. 2 Tage darauf wurde das zweite Uterushorn mit den Föten exstirpiert und wieder im Fruchtwasser und im mütterlichen Blute die Diastase bestimmt. Danach zeigte sich eine gewaltige Steigerung der Diastase im Mutterblute und eine sehr starke Vermehrung im Fruchtwasser, während das Blut der abgestorbenen Früchte nur äußerst wenig Diastase enthielt. Sie schlossen hieraus mit Recht, daß die Diastase im Fruchtwasser aus dem mütterlichen Blute stammen müßte. — Noch ein zweites haben unsere vergleichenden Untersuchungen von mütterlichem und Placentablut ergeben, nämlich, daß die Placenta den bei weitem größten Teil an Diastase aus dem mütterlichen Blute in sich aufspeichert. Dementsprechend ist ihr eigener Gehalt an Diastase sehr beträchtlich, nach eigenen vergleichenden Untersuchungen viel größer als der der Leber.

2. Lipase.

Nach den Untersuchungen von *Bondi* ist der Gehalt des Fruchtwassers an Lipase sehr schwankend; in sieben daraufhin untersuchten Fällen fand er viermal ein positives, dreimal ein negatives Resultat. Wir verwandten für unsere Studien die Tropfmethode nach *Rona* und *Michaelis* unter Verwendung gesättigter Tributyrinlösung und wählten folgende Versuchsanordnungen:

3 ccm Fruchtwasser wurden versetzt mit 20 ccm Tributyrinlösung + 1,0 ccm Phosphatgemisch (bestehend aus 1 ccm n/3 primärem und 7,0 ccm n/3 sekundärem Phosphat). Unmittelbar nach Herstellung der Mischung wurde sofort die Tropfenzahl festgestellt und dann wiederum nach 30, 60 und 90 Minuten langer Digestion im Wasserbade von 38° C die Tropfen gezählt. In folgender Tabelle teilen wir das Resultat von einigen unserer Versuche mit.

[1]) *M. Bial*, Pflügers Archiv **53**, 156, 1901.
[2]) *J. Wohlgemuth* und *M. Massone*, Arch. f. Gynäkol. u. Geburtshilfe **94**, Heft 21, 1910.

Tabelle III.

Versuch	Digestionszeit			
	sofort	nach 30′	nach 60′	nach 90′
1	176	168	167	167
2	176	163	153	150
3	173	144	136	136
4	173	168	166	163
5	168	168	168	168
6	172	172	172	172
7	169	169	169	169
8	168	168	168	168

Wir sehen, daß die Zahlen recht schwankend sind, bisweilen ist die Spaltung eine recht kräftige, bisweilen nur eine schwache, und daneben kommen auch Fälle vor, in denen eine Spaltung des Tributyrins überhaupt nicht zu erkennen ist.

Es fragt sich nun, worauf diese Schwankungen des Fruchtwassers im Lipasegehalt zurückzuführen sind und woher die Lipase im Fruchtwasser stammt. Drei Quellen können für die Lipase im Fruchtwasser in Betracht kommen: 1. das mütterliche Blut, 2. das kindliche Blut, 3. der Darmtraktus des Kindes. Nach den Untersuchungen von *Rona*[1]) und seinen Mitarbeitern hat man unter den tierischen Diastasen drei Typen zu unterscheiden: a) chininempfindliche, b) atoxylempfindliche, c) chinin- und atoxylempfindliche. Hierzu kommt noch ein von uns aufgefundener vierter Typus, welcher sich sowohl Chinin wie Atoxyl gegenüber ganz refraktär verhält. Wollten wir also über die Herkunft der Lipase etwas erfahren, so mußten wir feststellen, welchen Charakter die Lipase des Fruchtwassers besitzt. Von der Lipase des Serums wissen wir, daß sie gegen Chinin und Atoxyl empfindlich ist, und wir mußten nun zunächst feststellen, wie das kindliche Blut in dieser Beziehung sich verhält. Denn man konnte daran denken, daß die Lipase bei ihrem Durchtritt durch die Placenta ihren Charakter ändern könne. Dementsprechend untersuchten wir zunächst von ein und derselben Person das mütterliche Blut und Placentablut. Ersteres wurde durch Punktion der Cubitalvene, letzteres sofort nach Abnabeln des Kindes gewonnen. In den durch scharfes Zentrifugieren gewonnenen Sera ermittelten wir den Lipasegehalt und prüften gleichzeitig ihr Verhalten gegenüber Chinin und Atoxyl. Die Versuchsanordnung war so, daß wir 0,5 ccm Serum versetzten mit 20 ccm gesättigter wässeriger Tributyrinlösung und 1,0 ccm Phosphatgemisch (s. oben). Diese Mischung diente als Kontrolle, gleichzeitig wurde mit jedem Serum je ein Versuch mit 5 mg Chinin und je ein Versuch mit 5 mg Atoxyl angestellt und in allen nun nach Digestion von 30, 60 und 90 Minuten im Wasserbade die Tropfenzahl bestimmt. Das Ergebnis eines solchen Versuches teile ich in folgender Tabelle mit.

[1]) *P. Rona*, *Petow*, *Schreiber* und *Pavlovic*, Klin. Wochenschr. **1**, 2366, 1922; diese Zeitschr. **134**, 108, 1913.

Tabelle IV.

Versuch	Zeit	Kontrolle	+ 5 mg Chinin	+ 5 mg Atoxyl
			Mütterliches Blut	
1	Sofort	172	173	173
	Nach 30′	140	171	169
	„ 60	132	168	165
	„ 90	131	168	165
2	Sofort	171	173	172
	Nach 30′	138	171	168
	„ 60	131	166	164
	„ 90	131	166	164
			Placentablut	
1	Sofort	172	175	173
	Nach 30′	136	174	170
	„ 60	131	169	167
	„ 90	131	167	166
2	Sofort	170	173	170
	Nach 30′	142	170	169
	„ 60	134	165	167
	„ 90	132	165	164

Aus den mitgeteilten Zahlen ersehen wir zunächst, daß der Lipasegehalt des Placentablutes um nichts geringer ist als der des mütterlichen Blutes. Die Placenta hat also nichts von der Lipase des mütterlichen Blutes zurückgehalten. Und ebenso ist auch die Chinin- und Atoxylempfindlichkeit des Placentablutes ebenso stark wie die des mütterlichen Blutes.

Von der Pankreaslipase und der Darmlipase wissen wir, daß diese unempfindlich sind gegen Atoxyl, sehr empfindlich aber gegen Chinin.

Es fragte sich nun, wie verhält sich die Lipase des Fruchtwassers gegenüber Chinin und Atoxyl. Aus unseren Versuchsprotokollen wollen wir nur drei Versuche mitteilen.

Tabelle V.

Versuch		sofort	nach 30′	nach 60′	nach 90′
1	Kontrolle	173	168	166	163
	+ 5 mg Chinin	174	174	174	174
	+ 5 mg Atoxyl	174	168	166	168
2	Kontrolle	170	168	165	162
	+ 5 mg Chinin	172	172	172	169
	+ 5 mg Atoxyl	170	170	165	165
3	Kontrolle	169	169	155	155
	+ 5 mg Chinin	170	168	168	166
	+ 5 mg Atoxyl	169	165	156	156

Aus allen Versuchen geht deutlich hervor, daß die im Fruchtwasser bisweilen anzutreffende Lipase empfindlich gegen Chinin, unempfindlich aber gegen Atoxyl ist. Sie ist also wesentlich verschieden von der Lipase des mütterlichen und kindlichen Blutes, zeigt vielmehr den gleichen Charakter wie die aus dem Darm des Fötus stammende Lipase. Damit

stimmt auch unsere Beobachtung gut überein, daß im Fruchtwasser sich nur dann nennenswerte Mengen von Lipase nachweisen lassen, wenn dem Fruchtwasser Mekonium beigemengt ist. Denn in all den Fällen, in denen das Fruchtwasser keine Spur einer Beimengung von Mekonium zeigte, enthielt es auch keine Spur von Lipase. Hiernach könnte in Zukunft die Gegenwart von Lipase als ein gutes Kriterium für die Durchsetzung des Fruchtwassers mit Mekonium gelten. Gegen diese Schlußfolgerung, daß die im Fruchtwasser enthaltene Lipase aus dem kindlichen Darmtraktus stammen müsse, könnte noch der Einwand erhoben werden, daß es sich vielleicht doch in Wirklichkeit nur um eine Serumlipase handelt, und daß nur das Fruchtwasser die Serumlipase vor der Schädigung durch Atoxyl schütze. Wenn das der Fall war, so mußte Fruchtwasser zum Serum zugesetzt, die Atoxylempfindlichkeit der Serumlipase entweder gänzlich aufheben oder zum mindesten abschwächen. Der Versuch entschied jedoch das Gegenteil: Serumlipase wird in keiner Weise durch Fruchtwasser in ihrem Verhalten zu Chinin und Atoxyl beeinflußt. Demnach müssen wir als feststehende Tatsache annehmen, daß die im Fruchtwasser bisweilen enthaltene Lipase aus dem kindlichen Darmtraktus stammt.

3. Eiweißspaltende Fermente.

Bondi konnte im Fruchtwasser Pepsin nachweisen, dagegen kein Lab und kein Trypsin.

Die Abwesenheit von Lab bei einem Pepsingehalt, der, wie aus seinen Versuchen hervorgeht, nicht gar so gering war, schien uns im Widerspruch zu stehen mit der Tatsache, daß Lösungen, die Pepsin enthalten, gewöhnlich auch Labwirkung zu äußern imstande sind. Denn das Lab wirkt schon in weit schwächerer Konzentration als Pepsin.

a) Pepsin.

Wir untersuchten deshalb unsere verschiedenen Fruchtwasserportionen zunächst auf ihren Pepsingehalt und verfuhren dabei so, daß wir 2 ccm Fruchtwasser mit 1 ccm n/10 Salzsäure mischten. Das entspricht einer Acidität von 30, welche bekanntlich das Optimum für Pepsin ist. Zu diesen Mischungen gaben wir teils ungefärbtes Fibrin, teils Carminfibrin zu und setzten sie auf 2 bis 3 Stunden in ein Wasserbad von 38° C. Nach Ablauf der Frist kontrollierten wir den Verdauungsgrad und konnten in sämtlichen Fällen nur eine ganz minimale Pepsinwirkung feststellen. Denn die Flocken waren meist ganz erhalten und zeigten nur an den äußeren Enden einen ganz geringen Zerfall. Selbst nach 24stündigem Stehen bei Zimmertemperatur war der Effekt nicht größer geworden. Eine vollkommene Verdauung der Fibrinflocken haben wir in keinem Falle konstatieren können. Worauf dieser Unterschied zwischen unseren und *Bondis* Befunden beruht, vermögen wir nicht mit Sicherheit zu sagen. Es ist nicht unwahrscheinlich, daß die Reaktion des Fruchtwassers hierbei eine Rolle spielt. Die von uns untersuchten Portionen hatten sämtlich eine deutlich alkalische Reaktion bis $p_H = 7,7$. Nun wissen wir, daß Pepsin gegen Alkali außerordentlich empfindlich ist, und daß eine Regenerierung von Pepsin, das in alkalischer Lösung unwirksam geworden war, durch Zusatz von Salzsäure nur außerordentlich schwer gelingt. Es ist aber wohl möglich, daß wir mit stärker

alkalischem Fruchtwasser als *Bondi* gearbeitet haben, und daß deshalb der Zusatz von n/10 Salzsäure nicht imstande war, das Pepsin zu reaktivieren, obwohl wir die optimale Konzentration der Acidität 30 für unsere Versuche verwandten.

b) Lab.

Im Anschluß hieran untersuchten wir sämtliche Portionen auf die Gegenwart von Lab. Auch Lab ist gegen Alkali sehr empfindlich, besonders das beim Menschen vorkommende Parachymosin, und man mußte deshalb daran denken, daß ein Teil des Labs im Fruchtwasser durch die Alkaliwirkung bereits zerstört war. Man mußte ferner daran denken, daß das Lab sich im Fruchtwasser in seinem Zymogenzustand findet und daß, wenn man eine Labwirkung mit Fruchtwasser erzielen will, man vorher das Lab aus seinem Zymogenzustand in die aktive Form überführen muß. Zu diesem Zwecke verfuhren wir so, daß wir zunächst 2,0 ccm Fruchtwasser versetzten mit 1,0 ccm n/10 HCl und bei Zimmertemperatur 15 Minuten stehen ließen. In dieser Zeit mußte das Labzymogen, wenn solches vorhanden war, in Lab sich umwandeln. Dann wurde bis zur schwach sauren Reaktion durch Zusatz von Sodalösung die Salzsäure abgestumpft, das Gemisch in absteigenden Mengen auf eine kurze Reihe von Reagenzgläsern verteilt und zu jedem Gläschen 5,0 ccm Milch zugesetzt. Die Milch hatten wir vorher mit 10proz. Calciumchloridlösung im Verhältnis von 100 : 1 versetzt, um die Labwirkung möglichst zu begünstigen. Die Reihe wurde auf eine Stunde in ein Wasserbad von 38° C gesetzt und dann das Resultat kontrolliert. Dabei zeigte sich in allen von uns untersuchten Fällen, daß 2,0 ccm der Mischung eine komplette Gerinnung, 1,0 ccm eine partielle Gerinnung hervorzurufen imstande sind. Stärker ist die Labwirkung in keiner von uns untersuchten Portion ausgefallen. *Bondi* hat niemals eine Labwirkung beobachten können. Wahrscheinlich beruht sein negatives Resultat darauf, daß er nicht vorher eine Aktivierung des Labs, wie wir, vorgenommen hat. Denn eigentlich hätte er nach den weit größeren Pepsinmengen, die er im Fruchtwasser beobachtete, ein viel größeres Quantum Lab finden müssen als wir.

c) Trypsin.

Trypsin konnte von *Bondi* im Fruchtwasser nicht nachgewiesen werden. Er verwandte für diese Untersuchungen außer Fibrin auch die Chloroform-Gelatinemethode von *Fermi*. Wir bedienten uns gleichfalls der *Fermi*schen Methode, jedoch in einer anderen Form als *Bondi* sie anwandte, und zwar in Form eines Reihenversuches[1]), d. h. wir verteilten auf eine Reihe von Reagenzgläsern absteigende Mengen des Fruchtwassers und gaben zu jedem Gläschen 2,0 ccm 5proz. Chloroformgelatine zu. Dann stellten wir die Reihe in ein Wasserbad von 38° auf 2 Stunden und nachher auf 15 Minuten in Eiswasser. Wenn Trypsin in dem Untersuchungsmaterial vorhanden war, so mußte dasselbe die Gelatine verdauen und ungerinnbar gemacht haben, und es mußte der Inhalt der Gläschen, soweit genügend Trypsin in ihnen enthalten war, trotz starker Abkühlung flüssig geblieben sein. Auf diese Weise stellten wir fest, daß von sechs untersuchten Fruchtwässern nur ein einziges ein positives Resultat zeigte. Diese Portion war aber mit

[1]) Siehe *Wohlgemuth*, Grundriß der Fermentmethoden, S. 184. Berlin 1913.

Mekonium stark durchsetzt, und man darf wohl annehmen, daß das hier gefundene Trypsin aus dem kindlichen Darm stammte. Normaliter dürfte sich kein Trypsin im Fruchtwasser vorfinden.

4. Fibrinferment.

Endlich untersuchten wir noch das Fruchtwasser auf das Vorkommen von Fibrinferment. *Bondi* hat als Fibrinogenlösung in seinen Versuchen Hydrocelenflüssigkeit verwandt. Wir benutzten nach der Vorschrift von *Wohlgemuth*[1]) Magnesiumsulfatplasma, das wir uns aus Hammelblut in der Weise hergestellt hatten, daß wir 1 Teil 28proz. Magnesiumsulfatlösung versetzten mit 3 Teilen frischen Blutes. Nach Umschütteln wurde abzentrifugiert und von dem klaren überstehenden Plasma mit 1proz. Kochsalzlösung eine zehnfache Verdünnung hergestellt. Dann verteilten wir das Fruchtwasser in absteigenden Mengen auf eine Reihe Reagenzgläser, fügten zu jedem Gläschen 2,0 ccm der verdünnten Plasmalösung zu und setzten die Reihe auf 24 Stunden in den Eisschrank. Nach Ablauf der Frist wurde der Gerinnungszustand in den Gläschen kontrolliert. Von fünf daraufhin untersuchten Fällen zeigten alle in dem ersten Gläschen komplette Gerinnung und nur drei von ihnen auch im zweiten Gläschen ein Gerinnsel. Danach enthält Fruchtwasser wohl Fibrinferment, aber nur in geringen Mengen.

Zusammenfassend haben also unsere Untersuchungen folgendes ergeben:

1. Die Reaktion des Fruchtwassers schwankt zwischen $p_H = 7,5$ bis 7,7.

2. Das Fruchtwasser enthält verhältnismäßig große Mengen an Diastase, viel größere als sich im mütterlichen Blute finden, während im kindlichen Blut nur minimale Diastasemengen anzutreffen sind. Daraus wird gefolgert, daß die Diastase im Fruchtwasser vorwiegend aus dem mütterlichen Blute stammt.

3. Lipase findet sich nicht immer im Fruchtwasser. Ist sie aber dort anzutreffen, so stammt sie weder aus dem mütterlichen noch aus dem kindlichen Blute, sondern aus dem Darm des Fötus, denn sie ist ebenso wie Pankreas- und Darmlipase chininempfindlich, unempfindlich gegen Atoxyl.

4. Pepsin ist nur in ganz geringen Mengen im Fruchtwasser vorhanden.

5. Auch das Lab findet sich in ihm nur spärlich und muß erst aus seinem Zymogenzustand in die aktive Form übergeführt werden.

6. Trypsin hat sich in keinem Falle nachweisen lassen.

7. Fibrinferment fand sich in allen untersuchten Portionen, allerdings nur im geringen Maße.

Diese Arbeit ist zum Teil aus Mitteln bestritten, die wir der Hojimi-Hoshi-Stiftung verdanken.

[1]) *J. Wohlgemuth*, diese Zeitschr. 27, 79, 1910, und Grundriß der Fermentmethoden 1913, S. 320.

Über Blut als Saponinreagens.

Von

K. Vestlin, Vasa (Finnland).

(Eingegangen am 17. Oktober 1923.)

Hämolyse.

Ins Blut eingeführt, ruft das Saponin eine Veränderung der Blutzusammensetzung hervor. Diese Veränderung wird Hämolyse genannt. Worin besteht nun die Hämolyse?

Sie wird kurz als eine Auflösung der roten Blutkörperchen definiert. Das Wort Hämolyse ist zusammengesetzt aus den griechischen Wörtern: hâim'a = Blut und lysis = Auflösung. Diese Erscheinung kennzeichnet sich darin, daß das Stroma der roten Blutkörperchen, d. h. die Haut, welche sie umgibt, verletzt wird; das Hämoglobin wird frei und die Blutkörperchen schrumpfen zusammen und sterben ab.

Bei der Hämolyse kann man zwei Prozesse unterscheiden: das Absterben der roten Blutkörperchen und die physikalisch-chemischen Erscheinungen, die den Austritt des Hämoglobins aus den Blutkörperchen bedingen.

Oscar Gros faßt die Hämolyse als eine Summe von Teilerscheinungen auf, bei denen jeder Blutkörper seine eigene individuelle Rolle spielt und wobei der Gang der Hämolyse eine wesentliche und gesetzmäßige Beeinflussung von den aus ihrem ungleichen Alter herstammenden Verschiedenheiten bei den Blutkörperchen erfährt. Im Gegensatz hierzu meint *Arrhenius*, daß die einzelnen Blutkörperchen denselben Gesetzen folgen sollten wie die chemischen Moleküle. Diese Hypothese erklärt die Erscheinungen nicht so gut wie die vorige und scheint etwas gesucht zu sein. Bei der durch Saponin hervorgerufenen Hämolyse findet, wie *Ransom* anführt, eine Bindung von Saponin mittels Cholesterin aus den Stromata der roten Blutkörperchen statt, wobei ihr Gerüst eine nicht wiederherzustellende Verletzung erfährt. *Neumayer* sagt, daß die hämolytische Wirkung der Saponine darauf beruht, daß sie die Oberfläche der roten Blutkörperchen verletzen und sie umschließen. *K. Meyer* glaubt dagegen, daß die von Saponin hervorgerufene Hämolyse darin besteht, daß das Cholesterin im Blute einen Teil des Saponins bindet bei Auflösung von Lecithin im Saponin. Je höher der Cholesteringehalt bei den Blutkörperchen also ist, desto mehr Saponin bedarf man zur Hämolyse.

Die Hämolyse kann durch mehrere Ursachen hervorgerufen werden. Bringt man rote Blutkörperchen in Wasser, so schwellen sie an und geben schließlich ihren Inhalt, darunter Hämoglobin, an das Wasser ab. Diese Art von Hämolyse — spontane Hämolyse — wird verhindert, wenn man dem Wasser einen darin löslichen Stoff hinzufügt, wodurch eine Lösung von demselben osmotischen Druck wie das Blut zustande kommt. Eine derartige Lösung ist 0,85- bis 0,90proz. Natriumchloridlösung; diese Lösung wird auch bei allen Versuchen mit den roten Blutkörperchen angewendet. Dieselbe Eigenschaft hat eine 7proz. Lösung von Rohrzucker. In Blut findet man die roten Blutkörperchen gerade in einer solchen Flüssigkeit — dem sogenannten Blutserum. Saure und alkalische Lösungen und Alkohol rufen Hämolyse hervor, ebenso ein Zusatz von fettauflösenden Flüssigkeiten, wie Äther, Chloroform und andere, zu einer starken Blutlösung.

Die Hämolyse kann auch die Folge von gewaltsamer mechanischer Beschädigung oder Erfrieren der Blutkörperchen sein.

Eine Hitze von 70° ruft schnell Hämolyse hervor, aber auch bei niedriger Temperatur findet sie statt, wenn auch langsamer, so daß sie z. B. bei 60° eine halbe Stunde und bei 50° ungefähr 12 Stunden erfordert.

Interessant und von größter Wichtigkeit ist die Hämolyse, welche durch die sogenannten hämolytischen Gifte verursacht wird, die in kleinen Dosen wirken. Zu solchen einfachen gehören einige lösliche Mineralsalze, besonders Quecksilber- und Silbersalze, z. B. Quecksilberchlorid und Silbernitrat. Ferner gehören zu diesen Giften viele Stoffe aus dem Pflanzen- und Tierreich, unter ihnen das Schlangengift, Gift von Spinnen und Skorpionen, wie von Insekten — Bienen und Wespen —, Salz von Gallensäure, eine Anzahl Bakteriengifte, z. B. Vibriolysin, Tetanolysin und Streptolysin nebst den meisten Saponinarten.

Die zusammengesetzten Hämolysine werden oft im Serum von Blut angetroffen, das von einer anderen Tierspezies entnommen ist als der, von welcher die roten Blutkörperchen stammen.

Bordet behauptet, daß die zusammengesetzten Blutgifte ihre hämolytische Eigenschaft durch Zusammenarbeiten von zwei verschiedenen Körpern erhalten, von denen der eine Alexin, der andere Immunkörper genannt wird.

Gegen viele von den hämolytischen Giften gibt es Immunsera.

Für ein richtiges Verständnis der Erscheinungen auf dem Gebiete der Immunitätslehre ist das Studium der Hämolyse von größter Wichtigkeit. Neuerdings hat sie auch in der Chemie erhöhte Bedeutung erhalten; denn die hämolytische Wirkung ist das sicherste Erkennungszeichen für die Saponine.

Wenn sie nämlich bei einem aus den Phanerogamenpflanzen herstammenden Stoffe angetroffen wird, so deutet sie nach *Kobert* mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine Verwandtschaft mit den Saponingruppen hin.

Die Bedeutung dieser Hämolyse für die Chemie bewog auch den Verfasser im Winter 1912/13 einen Kursus in hämolytischer Technik unter Leitung des Vorstehers vom Veterinärlaboratorium der Medizinalverwaltung, Dr. *R. Hindersson*, durchzugehen, dem ich auf diese Weise meinen Dank für die Untersuchung und den freundlichen Rat bei der Arbeit aussprechen möchte.

Hierbei wurde dieselbe Methode befolgt, die im dänischen Seruminstitut zur Anwendung kommt.

Zuerst werde ich kurz das Verfahren beim hämolytischen Versuch beschreiben und sodann eine im obigen Laboratorium ausgeführte Arbeit näher auseinandersetzen.

Das Blut, seine Defibrinierung und Befreiung vom Serum.

Bei den hämolytischen Versuchen bedient man sich gewöhnlich des Rind- und Hammelblutes; andere Blutarten können auch zur Anwendung gebracht werden, z. B. Menschen-, Pferde-, Kaninchen- und Meerschweinchenblut. Hammelblut wird leicht hämolysiert, hat aber eine große spontane Hämolyse, wo diese dagegen beim Pferdeblut auf ein Geringes heruntergeht, und dieses ist wiederum empfindlicher als Rind- und Hammelblut.

Das Blut wird direkt in einer sterilisierten Flasche, die mit kleinen, gleichfalls sterilisierten Glasnieten ausgerüstet ist, gesammelt. Diese wird für die Defibrinierung des Blutes etwa 10 Minuten lang kräftig geschüttelt, bis das weiße Fibrin, welches sich zuerst in kleinen Mengen absondert, zu großen zusammenhängenden Flocken zusammenklebt.

Die Blutflüssigkeit muß nun zentrifugiert werden, um sie vom Serum zu befreien, und zu diesem Zwecke nimmt man zwei zu der Zentrifuge passende Glasröhren, die durch Kochen sterilisiert wurden; man mißt gleichviel Blut in jede Röhre ab und tariert genau mit physiologischer Kochsalzlösung (0,85proz.).

Die Zentrifuge, welche benutzt wurde, stammte aus *F. & M. Lautenschlägers* Fabrik, Berlin NO 18, 1910; sie wurde elektrisch getrieben und entwickelte eine Höchstgeschwindigkeit von 4000 Umdrehungen in der Minute bei einer Belastung von $\frac{1}{4}$ kg.

Die Röhren werden in die Zentrifuge eingesetzt und deren Geschwindigkeit allmählich nach 5 Minuten zum Maximum erhöht. Mit dieser Geschwindigkeit wurde das Zentrifugieren weitere 15 Minuten fortgesetzt, vielleicht länger, je nach dem Aussehen des Blutes bei der Untersuchung. Danach werden die Röhren herausgenommen und das Serum durch Absaugen mittels einer sterilisierten Pipette entfernt; die Salzlösung wird hinzugesetzt und das Zentrifugieren wiederholt. Nach erneuter Absonderung des Blutserums wird das Verfahren noch einmal wiederholt, wobei man durch Prüfen der im Glase befindlichen Überbleibsel sich davon überzeugt, daß die Konzentration der Blutkörperchen ausreichend ist. Sonst muß sie durch fortgesetztes Zentrifugieren noch mehr zusammengepreßt werden.

Zubereitung der Lösungen und Abmessen der Dosen.

Eine 1proz. Blutlösung, die man bei einem derartigen Versuch gewöhnlich anwendet, wird folgendermaßen zubereitet: man nimmt eine mit physiologischer Kochsalzlösung (0,85 Proz. NaCl) angefüllte Flasche von 200 ccm und mißt mit einer Pipette 2 ccm Blutkörperchen ab, welche man in die Flasche fallen läßt. Nach Umschütteln ist die Blutlösung fertig zum Gebrauch.

Wenn der Versuch, wie in unten erwähntem Falle, mit Saponin ausgeführt wird, bereitet man zuerst eine Lösung von der Stärke 1 : 10 so zu, daß 1 g Saponin in 10 ccm heißem, destilliertem Wasser aufgelöst wird. Hierauf ist es der Bequemlichkeit halber am zweckmäßigsten, sich sogleich

einige andere Verdünnungen von der ersten Lösung herzustellen, z. B. 1 : 100, dadurch, daß man 1 ccm von der Lösung 1 : 10 und 9 ccm destilliertes Wasser nimmt; 1 : 1000 durch gleiches Verfahren mit der Lösung 1 : 100 und 1 : 10 000 durch ähnliche Verdünnung der Lösung 1 : 1000.

Um also 1 ccm von einer Lösung 0,0008, d. h. 8 : 10 000 zu erhalten, wird mittels der kleinsten Pipette, z. B. 0,08, von der Lösung 1 : 100 abgemessen und 0,92 ccm destilliertes Wasser hinzugesetzt usw.

Das Herstellen der Farbenskala.

Um das Stattfinden der Hämolyse in Prozenten bestimmen zu können, stellt man eine Farbenskala dergestalt her, daß 1 ccm rote Blutkörperchen in 111 ccm Wasserleitungswasser aufgelöst wird.

Diese Hämoglobinlösung hat einen Gehalt, der der vollständigen Hämolyse einer 1proz. Blutlösung im Versuch entspricht, d. h. 9 Teile der Blutlösung und 1 Teil Lysinlösung. Diesen Grad der Hämolyse bezeichnen wir mit 100, d. h. 100 Proz. Blutkörperchen sind aufgelöst. Die Hämoglobinlösung wird nun in abnehmender Skala zubereitet, so daß z. B

8 ccm Blutlösung und 2 ccm Wasser 80 Proz. Hämolyse,
7 „ „ „ 3 „ „ 70 „ „

angeben.

Die Farbenskala besteht also aus einer Anzahl Reagenzgläser, wo die Farbe, dem Inhalt nach, einer Hämolyse von 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 35, 30, 25, 20, 16, 14, 12, 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2 und 1 Proz. entspricht. Beim Versuch 1 bis 9 wurde die vollständige Skala angewandt, aber sodann einer, welcher nur 100, 80, 60, 50, 40, 30, 20, 10 und 3 Proz. Hämolyse aufnahm.

Ausführung des Versuches.

In einer für Versuche bestimmten Reihe von Reagenzgläsern mit einem inneren Durchmesser von 1,7 cm wird die wirksame Substanz in gewünschter Lösung abgemessen und darauf die physiologische Kochsalzlösung ergänzt, bis die Flüssigkeitsmenge in der Röhre zusammen 2 ccm beträgt. Nun muß die Blutflüssigkeit hinzugefügt werden, was am besten durch Einspritzung mittels einer Spritze geschieht, wobei gleichzeitig mit dem Einspritzen ein kräftiges Durchschütteln der Flüssigkeit in dem Glase und der Einspritzung stattfindet. Die Reagenzgläser werden darauf umgeschüttelt, wobei man mit dem letzten anfängt und bis zum ersten fortsetzt — nicht umgekehrt, weil der Dosengehalt sich nicht durch Übertragen der Flüssigkeit mit dem Daumen verändern darf, den man beim Umschütteln an die Mündung der Röhre drückt.

Darauf werden die Reagenzgläser 2 Stunden lang in einen Thermostaten bei einer konstanten Temperatur von z. B. 37° gesetzt, worauf das Resultat notiert wird und die Reagenzgläser von neuem auf die soeben beschriebene Weise umgeschüttelt werden. Sodann bringt man die Gläser in einen Kühlschrank, wo sie über Nacht stehenbleiben; am folgenden Morgen werden sie wieder geprüft und man schreibt das Schlußresultat auf. Die Untersuchung ist beendigt.

Will man einen genauen quantitativen Versuch ausführen, so kühlt man die Reagenzgläser nach Ablauf der Hämolyse ab und zentrifugiert sofort oder nachdem die Gläser 1 bis 2 Stunden bei 0° gestanden haben. Als Zentrifugenglas dienen Glaszylinder, deren Boden in eine Kapillarröhre

ausmünden. Die Blutkörperchen werden beim Beginn des Zentrifugierens in die Kapillarröhre geschleudert und dann gemessen. Ihre Menge, von der ganzen Anzahl Blutkörperchen abgezogen, ergibt die Menge hämolysierter Blutkörperchen, und hieraus wird die Hämolyse genau berechnet.

Resultatsangabe.

Das Untersuchungsergebnis wird der Übersichtlichkeit halber in einer Tabelle wie folgt angegeben.

Versuch 1.

Pferdeblut (von heute). Wasserthermostat.

	Nr.	Saponinlösung ccm	Saponin, absol. Menge g	NaCl-lösung ccm	Blutlösung ccm	*Hämolyse* 2 Std.	*Hämolyse* auf Eis	Bemerkungen
37° C	1	1	0,01	1	8	100	100	Innerhalb 10 Minuten
37° C	2	0,1	0,001	1,9	8	100	100	
37° C	3	0,08	0,0008	1,92	8	100	100	1 : 12 500
37° C	4	0,07	0,0007	1,93	8	90	100	1 : 14 300
37° C	5	0,05	0,0005	1,95	8	70	90	
37° C	6	0,03	0,0003	1,97	8	40	70	Totale Hämolyse
37° C	7	1,1	0,0001	1,9	8	15	25	1 : 33 300
Kontrolle	+	—	—	2	8	0	0	
Kontrolle	++	—	—	2	8	0	0	17. XII. 1912

Diese Tabelle besagt, daß der Versuch im Wasserthermostaten bei 37° am 17. Dezember 1912 mit frischem Pferdeblut ausgeführt wurde; die Saponinmengen variierten zwischen 0,01 und 0,0001 g. Innerhalb 10 Minuten trat vollständige Hämolyse ein bei einer Aufspaltung des Saponins von 1 : 12500, und nachdem die Versuchsserien über Nacht auf Eis gestellt waren, wurde als Grenze für die vollständige Hämolyse bei 1 : 14300 und für die totale Hämolyse bei 1 : 33300 festgestellt. Ein oder zwei Kontrollproben wurden angewandt, um das etwaige Auftreten spontaner Hämolyse anzugeben. Spontane Hämolyse nennt man diejenige Hämolyse, welche bisweilen in einer physiologischen Kochsalz-Blutlösung eintritt, ohne Einwirkung von speziellen hämolytischen Fermenten.

Vollständige Hämolyse = 100 Proz.; totale Hämolyse = 50 Proz.; Spuren liegen vor, wenn die Probe stärkere Hämolyse als die Kontrollprobe aufweist, und 0 bedeutet, daß keine Hämolyse stattgefunden hat.

Der Zweck meiner Arbeit.

Als Arbeitsziel stellte ich folgende Fragen zur Beantwortung auf:

Welche von den drei am leichtesten zu Gebote stehenden Blutarten: Pferde-, Rinder- und Hammelblut, eignet sich am besten für den hämolytischen Versuch?

Welche ist die günstigste Temperatur für die Hämolyse?

Welches ist die untere Grenze für die hämolytische Wirkung von Gypsophila-Saponin?

a) berechnet nach 100proz. Hämolyse,
b) berechnet nach totaler (50proz.) Hämolyse,
c) berechnet nach Spuren (stärkere Hämolyse als bei der Kontrollprobe)?

Der Versuch.

Bei allen Versuchen wurde Gypsophilsaponin aus *Mercks* Fabrik in Deutschland verwendet; Blut abwechselnd vom Pferde, Rinde und Hammel. Bei allen Versuchen sollte das entnommene Blut noch an demselben Tage verwendet sein, aber dies war aus praktischen Gründen nicht immer möglich.

Für die meisten Temperaturen bediente ich mich des Wasserthermostaten, aber für 37 bis 38° gewöhnlich eines Luftthermostaten.

In den Tabellen sind die Lösungen in Kubikzentimetern, die Saponinmengen in Grammen und die Hämolyse in Prozenten angegeben. Die Verdünnung im Endresultat ist in abgerundeter Zahl, z. B. 1 : 33 300 anstatt 1 : 33 333 usw. angegeben.

Versuch 1.

Pferdeblut (von heute). Luftthermostat.

	Nr.	Saponinlösung ccm	Saponin, absol. Menge g	Na Cl-lösung ccm	Blutlösung ccm	Hämolyse 2 Std.	Hämolyse auf Eis	Bemerkungen
37 bis 37,5° C	1	1	0,1	1	8	100	100	Innerhalb 10 Minuten
	2	0,1	0,01	1,9	8	100	100	
	3	0,1	0,001	1,9	8	100	100	
	4	0,08	0,000 8	1,92	8	100	100	
	5	0,07	0,000 7	1,93	8	100	100	
	6	0,05	0,000 5	1,95	8	100	100	
	7	0,03	0,000 3	1,97	8	80	100	1 : 33 300
	8	0,1	0,000 1	1,9	8	25	35	
	9	0,05	0,000 05	1,95	8	10	10	
	10	0,1	0,000 01	1,9	8	8	8	1 : 1 000 000
	Kontrolle +	—	—	2	8	0	3	

Versuch 2.

Hammelblut (2 Tage alt). Luftthermostat.

	Nr.	Saponinlösung ccm	Saponin, absol. Menge g	Na Cl-lösung ccm	Blutlösung ccm	Hämolyse 2 Std.	Hämolyse auf Eis	Bemerkungen
37 bis 37,5° C	1	1	0,1	1	8	100	100	Innerhalb 10 Minuten
	2	0,1	0,01	1,9	8	100	100	
	3	0,1	0,001	1,9	8	100	100	
	4	0,08	0,000 8	1,92	8	100	100	
	5	0,07	0,000 7	1,93	8	100	100	
	6	0,05	0,000 5	1,95	8	100	100	1 : 20 000
	7	0,03	0,000 3	1,97	8	50	60	1 : 33 300
	8	0,1	0,000 1	1,9	8	40	30	
	9	0,05	0,000 05	1,95	8	40	30	
	10	0,1	0,000 01	1,9	8	25	25	
	Kontrolle +	—	—	2	8	0	25	

Versuch 3.

Rinderblut (2 Tage alt). Luftthermostat.

	Nr.	Saponinlösung ccm	Saponin, absol. Menge g	NaCl-lösung ccm	Blutlösung ccm	Hämolyse 2 Std.	Hämolyse auf Eis	Bemerkungen
37 bis 37,5° C	1	0,1	0,1	1,9	8	100	100	Innerhalb 10 Minuten
	2	0,1	0,001	1,9	8	90	100	1 : 10 000
	3	0,08	0,000 8	1,92	8	80	90	
	4	0,07	0,000 7	1,93	8	80	90	
	5	0,05	0,000 5	1,95	8	70	80	
	6	0,03	0,000 3	1,97	8	50	70	1 : 33 300
	7	0,1	0,000 1	1,9	8	12	12	
	8	0,05	0,000 05	1,95	8	12	12	
	9	0,1	0,000 01	1,9	8	12	12	
	Kontrolle +	—	—	2	8	12	12	

Versuch 4.

Rinderblut (wie im vorigen Versuch). Wasserthermostat.

	Nr.	Saponinlösung ccm	Saponin, absol. Menge g	NaCl-lösung ccm	Blutlösung ccm	Hämolyse 2 Std.	Hämolyse auf Eis	Bemerkungen
20 bis 22° C	1	0,1	0,001	1,9	8	0	5	Wahrscheinl. Fehler
	2	0,08	0,0008	1,92	8	90	90	
	3	0,07	0,0007	1,93	8	80	80	
	4	0,05	0,0005	1,95	8	40	60	Mögl. Umschlag.
	5	0,03	0,0003	1,97	8	60	80	1 : 33 300
	6	0,1	0,0001	1,9	8	0	5	1 : 100 000
	Kontrolle +	—	—	2	8	0	2	

Versuch 5.

Hammelblut (von heute). Wasserthermostat.

	Nr.	Saponinlösung ccm	Saponin, absol. Menge g	NaCl-lösung ccm	Blutlösung ccm	Hämolyse 2 Std.	Hämolyse auf Eis	Bemerkungen
20 bis 22° C	1	0,1	0,001	1,9	8	100	100	
	2	0,08	0,0008	1,92	8	100	100	
	3	0,07	0,0007	1,93	8	100	100	1 : 14 300
	4	0 05	0,0005	1,95	8	90	90	
	5	0,03	0,0003	1,97	8	60	60	
	6	0,1	0,0001	1,9	8	50	60	1 : 100 000
	Kontrolle +	—	—	2	8	0	3	

Versuch 6.

Rinderblut (wie früher). Wasserthermostat.

	Nr.	Saponinlösung ccm	Saponin, absol. Menge g	NaCl-lösung ccm	Blutlösung ccm	Hämolyse 2 Std.	Hämolyse auf Eis	Bemerkungen
25 bis 26° C	1	0,1	0,001	1,9	8	95	100	
	2	0,08	0 0008	1,92	8	90	100	1 : 12 500
	3	0,07	0,0007	1,93	8	70	80	
	4	0,05	0,0005	1,95	8	80	90	
	5	0,03	0,0003	1,97	8	60	60	1 : 33 300
	6	0,1	0,0001	1,9	8	+	6	1 : 100 000
	Kontrolle +	—	—	2	8	+	4	

\+ Noch nicht klar.

Versuch 7.

Hammelblut (wie früher). Wasserthermostat.

	Nr.	Saponinlösung ccm	Saponin, absol. Menge g	NaCl-lösung ccm	Blutlösung ccm	Hämolyse 2 Std.	Hämolyse auf Eis	Bemerkungen
25 bis 26° C	1	0,1	0,001	1,9	8	90	100	
	2	0,08	0,0008	1,92	8	100	100	
	3	0,07	0,0007	1,93	8	100	100	1 : 14 300
	4	0,05	0,0005	1,95	8	90	90	
	5	0,03	0,0003	1,97	8	60	60	1 : 33 300
	6	0,1	0,0001	1,9	8	20	25	1 : 100 000
Kontrolle	+	—	—	2	8	0	3	

Versuch 8.

Rinderblut (wie früher). Wasserthermostat.

	Nr.	Saponinlösung ccm	Saponin, absol. Menge g	NaCl-lösung ccm	Blutlösung ccm	Hämolyse 2 Std.	Hämolyse auf Eis	Bemerkungen
30 bis 31° C	1	0,1	0,001	1,9	8	95	100	1 : 10 000
	2	0,08	0,0008	1,92	8	90	95	
	3	0,07	0,0007	1,93	8	80	90	
	4	0,05	0,0005	1,95	8	70	80	
	5	0,03	0,0003	1,97	8	60	70	1 : 33 300
	6	0,1	0,0001	1,9	8	+	5	1 : 100 000
Kontrolle	+	—	—	2	8	+	2	

+ Noch nicht klar.

Versuch 9.

Hammelblut (wie früher). Wasserthermostat.

	Nr.	Saponinlösung ccm	Saponin, absol. Menge g	NaCl-lösung ccm	Blutlösung ccm	Hämolyse 2 Std.	Hämolyse auf Eis	Bemerkungen
30 bis 31° C	1	0,1	0,001	1,9	8	80	90	
	2	0,08	0,0008	1,92	8	95	95	
	3	0,07	0,0007	1,93	8	90	90	
	4	0,05	0,0005	1,95	8	90	90	
	5	0,03	0,0003	1,97	8	60	70	1 : 33 300
	6	0,1	0,0001	1,9	8	20	25	1 : 100 000
Kontrolle	+	—	—	2	8	0	2	

Versuche 2 und 3 konnten nicht verwendet werden, da sie zu hohe spontane Hämolyse aufwiesen. Nach diesen vorbereitenden Versuchen würde die Grenze für 100 Proz. Hämolyse zwischen einer Verdünnung von 1 : 10 000 und 1 : 14 300 und für die 50proz. Hämolyse zwischen 1 : 33 300 und 1 : 100 000 liegen; Spuren konnten noch bei einer Verdünnung von 1 : 1 000 000 beobachtet werden.

Die Temperatursteigerung von 20 auf 37° wirkt nicht merkbar auf die Hämolyse ein. Ein Sprung in der hämolytischen Intensität wurde ein paarmal beobachtet, d. h. die Hämolyse in einem Reagenzglase mit niedrigerem Saponingehalt war größer als in einem mit höherem.

Versuch 10.

Hammelblut (von gestern). Luftthermostat.

	Nr.	Saponinlösung ccm	Saponin, absol. Menge g	NaCl-lösung ccm	Blutlösung ccm	Hämolyse 2 Std.	Hämolyse auf Eis	Bemerkungen
37° C	1	0,1	0,001	1,9	8	100	100	
	2	0,08	0,000 8	1,92	8	100	100	
	3	0,07	0,000 7	1,93	8	100	100	
	4	0,05	0,000 5	1,95	8	100	100	1 : 20 000
	5	0,03	0,000 3	1,97	8	+	50	1 : 33 300
	6	0,02	0,000 2	1,98	8	+	40	
	7	0,1	0,000 1	1,9	8	+	35	
	8	0,08	0,000 08	1,92	8	+	20	
	Kontrolle +	—	—	2	8	—	3	

\+ Der Prozentgehalt kann noch nicht entschieden werden, da die Flüssigkeit sich nicht geklärt hat.

Versuch 11.

Pferdeblut (von heute). Luftthermostat.

	Nr.	Saponinlösung ccm	Saponin, absol. Menge g	NaCl-lösung ccm	Blutlösung ccm	Hämolyse 2 Std.	Hämolyse auf Eis	Bemerkungen
37° C	1	0,1	0,001	1,9	8	100	100	
	2	0,08	0,000 8	1,92	8	100	100	
	3	0,07	0,000 7	1,93	8	100	100	
	4	0,05	0,000 5	1,95	8	100	100	
	5	0,03	0,000 3	1,97	8	100	100	1 : 33 300
	6	0,02	0,000 2	1,98	8	90	90	
	7	0,1	0,000 1	1,9	8	+	80	
	8	0,08	0,000 08	1,92	8	+	50	1 : 125 000
	Kontrolle +	—	—	2	8	—	3	

\+ Trübe.

Versuch 12.

Hammelblut (von gestern).

	Nr.	Saponinlösung ccm	Saponin, absol. Menge g	NaCl-lösung ccm	Blutlösung ccm	Hämolyse 2 Std.	Hämolyse auf Eis	Bemerkungen
16,5° C Zimmertemperatur	1	0,1	0,001	1,9	8	100	100	
	2	0,08	0,000 8	1,92	8	90	95	
	3	0,07	0,000 7	1,93	8	80	100	1 : 14 300
	4	0,05	0,000 5	1,95	8	60	90	
	5	0,03	0,000 3	1,97	8	50	60	1 : 33 300
	6	0,02	0,000 2	1,98	8	30	40	
	7	0,1	0,000 1	1,9	8	20	20	
	8	0,08	0,000 08	1,92	8	10	20—	
	Kontrolle +	—	—	2	8	3 —	3—	

Versuch 13.

Pferdeblut (von heute).

	Nr.	Saponinlösung ccm	Saponin, absol. Menge g	NaCl-lösung ccm	Blutlösung ccm	Hämolyse 2 Std.	Hämolyse auf Eis	Bemerkungen
16,5° C Zimmertemperatur	1	0,1	0,001	1,9	8	100	100	
	2	0,08	0,000 8	1,92	8	100	100	
	3	0,07	0,000 7	1,93	8	100	100	
	4	0,05	0,000 5	1,95	8	95	100	
	5	0,03	0,000 3	1,97	8	100	100	1 : 33 300
	6	0,02	0,000 2	1,98	8	80	90	1 : 50 000
	7	0,1	0,000 1	1,9	8	20	4C	
	8	0,08	0,000 08	1,92	8	20	30	
	Kontrolle +	—	—	2	8	3 —	3—	

Versuch 14.

Hammelblut (von gestern). Wasserthermostat.

Nr.		Saponinlösung ccm	Saponin, absol. Menge g	NaCl-lösung ccm	Blutlösung ccm	Hämolyse 2 Std.	Hämolyse auf Eis	Bemerkungen
25 bis 27° C	1	0,1	0,001	1,9	8	100	100	
	2	0,08	0,000 8	1,92	8	100	100	
	3	0,07	0,000 7	1,93	8	95	100	1 : 14 300
	4	0,05	0,000 5	1,95	8	90	95	
	5	0,03	0,000 3	1,97	8	40	60	
	6	0,02	0,000 2	1,98	8	40	50–	1 : 50 000
	7	0,1	0,000 1	1,9	8	+	30	
	8	0,08	0,000 08	1,92	8	+	20	
Kontrolle +		—	—	2	8	—	3–	

+ Trübe.

Versuch 15.

Pferdeblut (von heute). Wasserthermostat.

Nr.		Saponinlösung ccm	Saponin, absol. Menge g	NaCl-lösung ccm	Blutlösung ccm	Hämolyse 2 Std.	Hämolyse auf Eis	Bemerkungen
25 bis 27° C	1	0,1	0,001	1,9	8	100	100	
	2	0,08	0,000 8	1,92	8	100	100	
	3	0,07	0,000 7	1,93	8	100	100	
	4	0,05	0,000 5	1,95	8	100	100	1 : 20 000
	5	0,03	0,000 3	1,97	8	80	90	
	6	0,02	0,000 2	1,98	8	60	80	
	7	0,1	0,000 1	1,9	8	40	60	1 : 100 000
	8	0,08	0,000 08	1,92	8	30	40	
Kontrolle +		—	—	2	8	+	3–	

+ Trübe.

Versuch 16.

Hammelblut (von heute). Wasserthermostat.

Nr.		Saponinlösung ccm	Saponin, absol. Menge g	NaCl-lösung ccm	Blutlösung ccm	Hämolyse 2 Std.	Hämolyse auf Eis	Bemerkungen
21,5 bis 23° C	1	0,1	0,001	1,9	8	100	100	
	2	0,08	0,000 8	1,92	8	100	100	
	3	0,07	0,000 7	1,93	8	100	100	1 : 14 300
	4	0,05	0,000 5	1,95	8	60	80	
	5	0,03	0,000 3	1,97	8	50	50	1 : 33 300
	6	0,02	0,000 2	1,98	8	40	45	
	7	0,1	0,000 1	1,9	8	30	30	
	8	0,08	0,000 08	1,92	8	3	3	
Kontrolle +		—	—	2	8	3–	3–	

Versuch 17.

Pferdeblut (von gestern). Wasserthermostat.

Nr.		Saponinlösung ccm	Saponin, absol. Menge g	NaCl-lösung ccm	Blutlösung ccm	Hämolyse 2 Std.	Hämolyse auf Eis	Bemerkungen
21,5 bis 23° C	1	0,1	0,001	1,9	8	100	100	
	2	0,08	0,000 8	1,92	8	100	100	
	3	0,07	0,000 7	1,93	8	100	100	
	4	0,05	0,000 5	1,95	8	100	100	
	5	0,03	0,000 3	1,97	8	100	100	1 : 33 300
	6	0,02	0,000 2	1,98	8	80	90	
	7	0,1	0,000 1	1,9	8	30	50	1 : 100 000
	8	0,08	0,000 08	1,92	8	25	40	
Kontrolle +		—	—	2	8	3–	3–	

Versuch 18.

Hammelblut (von heute). Wasserthermostat.

	Nr.	Saponinlösung ccm	Saponin, absol. Menge g	NaCl-lösung ccm	Blutlösung ccm	Hämolyse 2 Std.	Hämolyse auf Eis	Bemerkungen
32° C	1	0,1	0,001	1,9	8	100	100	
32° C	2	0,08	0,000 8	1,92	8	100	100	
32° C	3	0,07	0,000 7	1,93	8	100	100	1 : 14 300
32° C	4	0,05	0,000 5	1,95	8	80	90	
32° C	5	0,03	0,000 3	1,97	8	+	60	1 : 33 300
32° C	6	0,02	0,000 2	1,98	8	+	40	
32° C	7	0,1	0,000 1	1,9	8	+	30	
32° C	8	0,08	0,000 08	1,92	8	20−	20	
	Kontrolle +	—	—	2	8	—	3−	

+ Trübe.

Versuch 19.

Pferdeblut (von gestern). Wasserthermostat.

	Nr.	Saponinlösung ccm	Saponin, absol. Menge g	NaCl-lösung ccm	Blutlösung ccm	Hämolyse 2 Std.	Hämolyse auf Eis	Bemerkungen
32° C	1	0,1	0,001	1,9	8	100	100	
32° C	2	0,08	0,000 8	1,92	8	100	100	
32° C	3	0,07	0,000 7	1,93	8	100	100	
32° C	4	0,05	0,000 5	1,95	8	100	100	
32° C	5	0,03	0,000 3	1,97	8	100	100	1 : 33 300
32° C	6	0,02	0,000 2	1,98	8	60	80	1 : 50 000
32° C	7	0,1	0,000 1	1,9	8	30	30	
32° C	8	0,08	0,000 08	1,92	8	20	25	
	Kontrolle +	—	—	2	8	+	3+	

+ Trübe.

Versuch 20.

Hammelblut (von gestern). Wasserthermostat.

	Nr.	Saponinlösung ccm	Saponin, absol. Menge g	NaCl-lösung ccm	Blutlösung ccm	Hämolyse 2 Std.	Hämolyse auf Eis	Bemerkungen
42° C	1	0,1	0,001	1,9	8	100	100	
42° C	2	0,08	0,000 8	1,92	8	100	100	
42° C	3	0,07	0,000 7	1,93	8	100	100	
42° C	4	0,05	0,000 5	1,95	8	100	100	1 : 20 000
42° C	5	0,03	0,000 3	1,97	8	80	90	1 : 33 300
42° C	6	0,02	0,000 2	1,98	8	+	40	
42° C	7	0,1	0,000 1	1,9	8	—	10	
42° C	8	0,08	0,000 08	1,92	8	—	20	
	Kontrolle +	—	—	2	8	—	3−	

+ Trübe.

Versuch 21.

Pferdeblut (von gestern). Wasserthermostat.

	Nr.	Saponinlösung ccm	Saponin, absol. Menge g	NaCl-lösung ccm	Blutlösung ccm	Hämolyse 2 Std.	Hämolyse auf Eis	Bemerkungen
42° C	1	0,1	0,001	1,9	8	100	100	
42° C	2	0,08	0,000 8	1,92	8	100	100	
42° C	3	0,07	0,000 7	1,93	8	100	100	
42° C	4	0,05	0,000 5	1,95	8	100	100	
42° C	5	0,03	0,000 3	1,97	8	100	100	
42° C	6	0,02	0,000 2	1,98	8	100	100	1 : 50 000
42° C	7	0,1	0,000 1	1,9	8	+	30	
42° C	8	0,08	0,000 08	1,92	8	—	25	
	Kontrolle +	—	—	2	8	—	3	

+ Trübe.

Versuch 22.

Hammelblut (von heute). Wasserthermostat.

	Nr.	Saponinlösung ccm	Saponin, absol. Menge g	Na Cl-lösung ccm	Blutlösung ccm	Hämolyse 2 Std.	Hämolyse auf Eis	Bemerkungen
50° C	1	0,03	0,000 3	1,97	8	80	100	1 : 33 300
	2	0,025	0,000 25	1,975	8	+	80	
	3	0,02	0,000 2	1,98	8	+	70	
	4	0,015	0,000 15	1,985	8	+	50	1 : 66 700
	5	0,1	0,000 1	1,9	8	+	40	
	Kontrolle +	—	—	2	8	—	20–	

+ Trübe.

Versuch 23.

Pferdeblut (von gestern). Wasserthermostat.

	Nr.	Saponinlösung ccm	Saponin, absol. Menge g	Na Cl-lösung ccm	Blutlösung ccm	Hämolyse 2 Std.	Hämolyse auf Eis	Bemerkungen
50° C	1	0,02	0,000 2	1,98	8	80	100	
	2	0,015	0,000 15	1,985	8	50	100	1 : 66 700
	3	0,1	0,000 1	1,9	8	40	95	
	4	0,08	0,000 08	1,92	8	+	90	
	5	0,07	0,000 07	1,93	8	+	90	
	6	0,05	0,000 05	1,95	8	+	70	
	7	0,03	0,000 03	1,97	8	+	80	
	8	0,1	0,000 01	1,9	8	+	90	
	Kontrolle +	—	—	2	8	—	70	

+ Trübe.

Versuche 22 und 23 wurden angestellt, um den Grenzwert bei 50° zu bestimmen. Da Wärme Hämolyse bewirkt und die spontane Hämolyse der Kontrollprobe zufolge allzu hoch ist, muß die Probe als unverwendbar verworfen werden. Auf Grund dessen wurde kein Versuch mit Rinderblut bei dieser Temperatur angestellt.

Versuch 24.

Rinderblut (von heute).

	Nr.	Saponinlösung ccm	Saponin, absol. Menge g	Na Cl-lösung ccm	Blutlösung ccm	Hämolyse 2 Std.	Hämolyse auf Eis	Bemerkungen
16,5° C Zimmertemperatur	1	0,1	0,001	1,9	8	100	100	1 : 10 000
	2	0,05	0,000 5	1,95	8	30	50	1 : 20 000
	3	0,03	0,000 3	1,97	8	10	10	
	4	0,02	0,000 2	1,98	8	3	10+	
	5	0,1	0,000 1	1,9	8	3–	8	1 : 100 000
	6	0,08	0,000 08	1,92	8	3–	3	
	7	0,05	0,000 05	1,95	8	3–	3	
	Kontrolle +	—	—	2	8	3–	3	

Versuch 25.

Rinderblut (von heute). Wasserthermostat.

	Nr.	Saponinlösung ccm	Saponin, absol. Menge g	NaCl-lösung ccm	Blutlösung ccm	Hämolyse 2 Std.	Hämolyse auf Eis	Bemerkungen
22° C	1	0,1	0,001	1,9	8	100	100	1 : 10 000
	2	0,05	0,000 5	1,95	8	60	90	1 : 20 000
	3	0,03	0,000 3	1,97	8	25	40	
	4	0,02	0,000 2	1,98	8	10	10	
	5	0,1	0,000 1	1,9	8	10−	10−	
	6	0,08	0,000 08	1,92	8	10−	10−	1 : 125 000
	7	0,05	0,000 05	1,95	8	3	3	
	Kontrolle +	—	—	2	8	3	3	

Versuch 26.

Rinderblut (von heute). Wasserthermostat.

	Nr.	Saponinlösung ccm	Saponin, absol. Menge g	NaCl-lösung ccm	Blutlösung ccm	Hämolyse 2 Std.	Hämolyse auf Eis	Bemerkungen
27° C	1	0,1	0,001	1,9	8	100	100	
	2	0,05	0,000 5	1,95	8	80	100	1 : 20 000
	3	0,03	0,000 3	1,97	8	40	60	1 : 33 300
	4	0,02	0,000 2	1,98	8	30	30	
	5	0,1	0,000 1	1,9	8	10	10	
	6	0,08	0,000 08	1,92	8	+	3+	1 : 125 000
	7	0,05	0,000 05	1,95	8	3	3	
	Kontrolle +	—	—	2	8	+	3	

\+ Trübe.

Versuch 27.

Rinderblut (von heute). Wasserthermostat.

	Nr.	Saponinlösung ccm	Saponin, absol. Menge g	NaCl-lösung ccm	Blutlösung ccm	Hämolyse 2 Std.	Hämolyse auf Eis	Bemerkungen
32° C	1	0,1	0,001	1,9	8	100	100	
	2	0,05	0,000 5	1,95	8	80	100	1 : 20 000
	3	0,03	0,000 3	1,97	8	+	50−	1 : 33 300
	4	0,025	0,000 25	1,975	8	—	10+	
	5	0,02	0,000 2	1,98	8	—	10	
	6	0,015	0,000 15	1,985	8	—	10−	
	7	0,1	0,000 1	1,9	8	—	10−	1 : 125 000
	8	0,08	0,000 08	1,92	8	—	10−	
	9	0,05	0,000 05	1,95	8	—	3	
	Kontrolle +	—	—	2	8	—	3	

\+ Trübe.

Versuch 28.

Rinderblut (von heute). Luftthermostat.

	Nr.	Saponinlösung ccm	Saponin, absol. Menge g	NaCl-lösung ccm	Blutlösung ccm	Hämolyse 2 Std.	Hämolyse auf Eis	Bemerkungen
37 bis 38,8° C	1	0,1	0,001	1,9	8	100	100	
	2	0,05	0,000 5	1,95	8	90	100	1 : 20 000
	3	0,03	0,000 3	1,97	8	60	90	
	4	0,025	0,000 25	1,975	8	40	80	
	5	0,02	0,000 2	1,98	8	30	70	1 : 50 000
	6	0,015	0,000 15	1,985	8	10	10	
	7	0,1	0,000 1	1,9	8	10	10	
	8	0,08	0,000 08	1,92	8	+	3+	1 : 125 000
	9	0,05	0,000 05	1,95	8	—	3	
	Kontrolle +	—	—	2	8	—	3	

\+ Trübe.

Versuch 29.

Rinderblut (von heute). Wasserthermostat.

	Nr.	Saponinlösung ccm	Saponin, absol. Menge g	NaCl-lösung ccm	Blutlösung ccm	Hämolyse 2 Std.	Hämolyse auf Eis	Bemerkungen
42° C	1	0,1	0,001	1,9	8	100	100	
	2	0,05	0,000 5	1,95	8	95	100	1 : 20 000
	3	0,03	0,000 3	1,97	8	+	90	
	4	0,025	0,000 25	1,975	8	—	80	1 : 40 000
	5	0,02	0,000 2	1,98	8	—	30+	
	6	0,015	0,000 15	1,985	8	—	10−	
	7	0,1	0,000 1	1,9	8	—	10	
	8	0,08	0,000 08	1,92	8	—	10−	1 : 125 000
	9	0,05	0,000 05	1,95	8	—	3	
	Kontrolle +	—	—	2	8	—	3	

\+ Trübe.

Versuch 30.

Hammelblut (von heute). Luftthermostat.

	Nr.	Saponinlösung ccm	Saponin, absol. Menge g	NaCl-lösung ccm	Blutlösung ccm	Hämolyse 2 Std.	Hämolyse auf Eis	Bemerkungen
37° C	1	0,03	0,000 3	1,97	8	+	60	
	2	0,025	0,000 25	1,975	8	—	60	
	3	0,02	0,000 2	1,98	8	—	50	1 : 50 000
	4	0,015	0,000 15	1,985	8	—	40	
	5	0,1	0,000 1	1,9	8	—	20	
	Kontrolle +	—	—	2	8	—	3	

\+ Trübe.

Versuch 31.

Pferdeblut (von heute). Luftthermostat.

	Nr.	Saponinlösung ccm	Saponin, absol. Menge g	NaCl-lösung ccm	Blutlösung ccm	Hämolyse 2 Std.	Hämolyse auf Eis	Bemerkungen
37° C	1	0,1	0,000 1	1,9	8	30	50	1 : 100 000
	2	0,08	0,000 08	1,92	8	20	30	
	3	0,07	0,000 07	1,93	8	+	20	
	4	0,05	0,000 05	1,95	8	—	10	
	5	0,03	0,000 03	1,97	8	—	10−	
	6	0,1	0,000 01	1,9	8	—	3	1 : 1 000 000
	Kontrolle —	—	—	2	8	—	3−	

\+ Trübe.

Versuch 32.

Hammelblut (von heute). Wasserthermostat.

	Nr.	Saponinlösung ccm	Saponin, absol. Menge g	NaCl-lösung ccm	Blutlösung ccm	Hämolyse 2 Std.	Hämolyse auf Eis	Bemerkungen
37° C	1	0,03	0,000 3	1,97	8	+	60	
	2	0,025	0,000 25	1,975	8	—	40++	1 : 40 000
	3	0,02	0,000 2	1,98	8	—	40	
	4	0,015	0,000 15	1,985	8	—	30	
	5	0,1	0.000 1	1,9	8	—	20	
	Kontrolle +	—	—	2	8	—	3	

\+ Trübe.

++ Sollte wahrscheinlich 50 Proz. aufweisen; aber beim Umschütteln der Saponinlösung wurde ein Teil verschüttet.

Der Übersichtlichkeit wegen habe ich diese Versuche in 3 Tabellen nach der Blutart zusammengestellt, die beim Versuch verwendet wurde.

Hammelblut.

Nr.	Temperatur °C	Thermostat	Blut	Aufspaltung von Saponin	100 Proz. Hämolyse	50 Proz. Hämolyse	Spuren von Hämolyse	Spontane Hämolyse
12	16,5	Wasser	von gestern	1 : 10 000—1 : 125 000	1 : 14 300	1 : 33 300	1 : 125 000	3
5	20—22	„	„ heute	1 : 10 000—1 : 100 000	1 : 14 300	1 : 100 000	—	3
16	21,5—23	„	„ „	1 : 10 000—1 : 125 000	1 : 14 300	1 : 33 300	1 : 125 000	3
7	25—26	„	„ gestern	1 : 10 000—1 : 100 000	1 : 14 300	1 : 33 300	1 : 100 000	3
14	25—27	„	„ „	1 : 10 000—1 : 125 000	1 : 14 300	1 : 50 000	1 : 125 000	3
9	30—31	„	„ „	1 : 10 000—1 : 100 000	—	1 : 33 300	—	3
18	32	„	„ heute	1 : 10 000—1 : 125 000	1 : 14 300	1 : 33 300	1 : 125 000	3
10	37	Luft	„ gestern	1 : 10 000—1 : 125 000	1 : 20 000	1 : 33 300	1 : 125 000	3
30	37	„	„ heute	1 : 10 000—1 : 67 000	—	1 : 50 000	—	3
32	37	Wasser	„ „	1 : 10 000—1 : 67 000	—	1 : 40 000	—	3
2	37—37,5	Luft	2 Tage alt	1 : 100—1 : 1 000 000	1 : 20 000	1 : 33 300	1 : 200 000	25
20	42	Wasser	von heute	1 : 10 000—1 : 125 000	1 : 20 000	1 : 33 300	1 : 125 000	3
22	50	„	„ „	1 : 30 000—1 : 100 000	1 : 33 300	1 : 67 000	1 : 125 000	20

Rinderblut.

Nr.	Temperatur °C	Thermostat	Blut	Aufspaltung von Saponin	100 Proz. Hämolyse	50 Proz. Hämolyse	Spuren von Hämolyse	Spontane Hämolyse
24	16,5	Wasser	von heute	1 : 10 000—1 : 200 000	1 : 10 000	1 : 20 000	1 : 100 000	3
4	20—22	„	3 Tage alt	1 : 10 000—1 : 100 000	—	1 : 33 300	—	2
25	22	„	von heute	1 : 10 000—1 : 200 000	1 : 10 000	1 : 20 000	1 : 125 000	3
6	25—26	„	4 Tage alt	1 : 10 000—1 : 100 000	1 : 12 500	1 : 33 300	1 : 100 000	4
26	27	„	von heute	1 : 10 000—1 : 200 000	1 : 20 000	1 : 33 300	1 : 125 000	3
8	30—31	„	4 Tage alt	1 : 10 000—1 : 100 000	1 : 10 000	1 : 33 300	1 : 100 000	2
27	32	„	von heute	1 : 10 000—1 : 200 000	1 : 20 000	1 : 33 300	1 : 125 000	3
28	37—38	Luft	„ „	1 : 10 000—1 : 200 000	1 : 20 000	1 : 50 000	1 : 125 000	3
3	36,5—37	Wasser	3 Tage alt	1 : 1 000—1 : 1 000 000	1 : 10 000	1 : 33 300	—	12
29	42	„	von heute	1 : 10 000—1 : 200 000	1 : 20 000	1 : 40 000	1 : 125 000	3

Pferdeblut.

Nr.	Temperatur °C	Thermostat	Blut	Aufspaltung von Saponin	100 Proz. Hämolyse	50 Proz. Hämolyse	Spuren von Hämolyse	Spontane Hämolyse
13	16,5	Wasser	von heute	1 : 10 000—125 000	1 : 33 300	1 : 50 000	—	3
17	21,5—23	"	" gestern	1 : 10 000—125 000	1 : 33 300	1 : 100 000	—	3
15	25—27	"	" heute	1 : 10 000—125 000	1 : 20 000	1 : 100 000	—	3
19	32	"	" gestern	1 : 10 000—125 000	1 : 33 300	1 : 50 000	—	3
31	37	Luft	" heute	1 : 100 000—1 000 000	—	1 : 100 000	1 : 1 000 000	3
1	35—37,5	"	" "	1 : 100—1 000 000	1 : 33 300	1 : 33 300	1 : 1 000 000	3
11	37	"	" "	1 : 10 000—125 000	1 : 33 300	1 : 125 000	—	3
21	42	Wasser	" gestern	1 : 10 000—125 000	1 : 50 000	1 : 50 000	—	3
23	50	"	" "	1 : 50 000—1 000 000	1 : 66 700	1 : 1 000 000	—	70

Die erste Tabelle auf Seite 23 gibt an, daß die günstigste Temperatur für Hämolyse des Hammelblutes 37° war, ganz unabhängig davon, ob sie im Luft- oder Wasserthermostaten hervorgerufen wurde. Das zufällig beim Versuch 5 erreichte Resultat muß auf irgend einem Irrtum beruhen, und Versuch 2 und 22 können auf Grund des zu hohen Grades spontaner Hämolyse nicht berücksichtigt werden.

Vollständige Hämolyse trat bei 37° bei einer Auflösung des Saponins von 1 : 20000 ein, totale Hämolyse bei 1 : 50000 und Spuren von Hämolyse wurden noch bei 1 : 125000 beobachtet.

Probe 3 in zweiter Tabelle auf Seite 23 ergab zu hohe spontane Hämolyse, so daß sie nicht verwendet werden konnte.

Versuch mit Rinderblut wurde bei 50° nicht angestellt. Auch jetzt erwies sich 37° als die günstigste Temperatur; vollständige Hämolyse trat bei einer Verdünnung von 1 : 20000 ein, totale Hämolyse bei 1 : 50000 und Spuren wurden bei 1 : 125000 bemerkt.

Probe Nr. 23 in Tabelle auf Seite 24 war unverwendbar, da sie zu hohe spontane Hämolyse aufwies. 37 bis 42° erwiesen sich als die günstigste Temperatur für die Hämolyse des Pferdeblutes; vollständige Hämolyse trat bei einer Verdünnung von 1 : 50000, totale Hämolyse bei 1 : 125000, und Spuren zeigten sich noch bei 1 : 1000000. Ein Sprung in der Hämolyse, d. h. daß die Hämolyse in einer Röhre mit niederem Saponingehalt stärker war als in einer Röhre mit höherem, zeigte sich in den Versuchen 4, 6, 9, 12 und 23.

Bemerkenswert ist, daß in Versuch 1 die Hämolyse so schnell auftrat, daß vollständige Hämolyse innerhalb 10 Minuten bei 1 : 10000 beobachtet werden konnte.

Zusammenfassung des Ergebnisses.

Da bei der Identifizierung von Saponin vermittelst Farbenreaktionen, Terpentinöle, Quecksilber oder bei der Spaltung relativ konzentrierte Lösungen von 1 : 10 oder 1 : 100 erforderlich sind,

um das Resultat deutlich erkennen zu können, und da beim Beobachten des charakteristischen Schaumes dieser bei einer größten Verdünnung von 1 : 20000 wahrgenommen wird, so scheinen diese Versuche die Behauptung zu stützen, daß Blut das beste bis jetzt bekannte Reagens auf Saponinsubstanzen ist. Von den drei erwähnten Blutarten übertrifft das Pferdeblut an Empfindlichkeit die beiden anderen Arten bedeutend, welche ungefähr gleich gut sind, und weist einen geringeren Grad spontaner Hämolyse auf, weshalb es besser als diese sich als Reagens auf Saponine und im allgemeinen für hämolytische Versuche eignet. Ausgeschlossen ist es indessen nicht, daß man eine Blutart antreffen kann, die sich als bedeutend empfindlicher als Pferdeblut erweisen sollte, aber es hat jedenfalls den Vorteil leicht erreichbar zu sein.

Die günstigste Temperatur betreffs der Hämolyse blieb 37° für Hammel- und Rinderblut, aber 37 bis 42° für Pferdeblut.

Die untere Grenze für die hämolytische Wirksamkeit des Gypsophilsaponins, nach vollständiger Hämolyse berechnet, stellte sich als eine Verdünnung von 1 : 50000 heraus; nach totaler Hämolyse 1 : 125000 und nach Spuren von Hämolyse 1 : 1000000.

Zur Frage nach dem Einfluß von Arsen- und Antimonverbindungen auf die fermentativen Funktionen des Organismus.

II. Mitteilung[1]).

Der Einfluß einiger Arsen- und Antimonpräparate auf das Pepsin.

Von

J. A. Smorodinzew und **N. P. Riabouschinsky.**

(Aus der chemotherapeutischen Abteilung des Tropeninstituts des Volkskommissariats für Gesundheitswesen in Moskau.)

(Eingegangen am 13. Oktober 1923.)

Durch zahlreiche Beobachtungen wurde festgestellt[2]), daß Arsenpräparate die Absonderung des Magensaftes verstärken, aber auf welche Weise sie den Prozeß der Eiweißverdauung im Magen beeinflussen, bleibt noch beinahe unaufgeklärt.

Nach *Schäfers* und *Böhms*[3]) Versuchen üben 0,2- bis 0,4proz. Arsensäurelösungen auf die Verdauung von Hühnereiweiß durch Pepsin keinen Einfluß aus. *R. Chittenden* und *E. Allen*[4]) fanden, daß Arsen- und arsenige Säure in 0,2- bis 5proz. Konzentrationen die Spaltung des Fibrins durch Pepsin beschleunigen, während dieselbe durch 5- bis 10proz. Lösungen hintangehalten wird. Nach *Aschers*[5]) Beobachtungen verlangsamen Natrium Kakodylicum und Atoxyl (der Prozentgehalt ist nicht angegeben) die Hydrolyse des Ricins durch Pepsin ein wenig. Dem ähnlich beobachtete *Pincussohn*[6]), daß Präparate von kolloidalem Arsen in geringen Dosen ($^1/_{60000}$ 20proz. Lösung) auf die Verdauung von Edestin durch Pepsin keine Wirkung ausüben, in großen ($^1/_{5000}$ bis $^1/_{30000}$ 20proz. Lösungen) dieselbe hintanhalten. Alle diese Forscher arbeiteten mit verschiedenen Eiweißen und erhielten nicht ganz vergleichbare Resultate, da, wie bekannt, der Grad der Verdaulichkeit durch Pepsin sehr von der Natur des Eiweißes abhängt[7]).

---

[1]) I. Mitteilung: *J. A. Smorodinzew* und *Fr. E. A. Iliin*, diese Zeitschr. **141**, 297, 1923.

[2]) *J. A. Smorodinzew*, Arsen in der Chemotherapie. Arbeiten des Tropeninstituts 1923 (russisch).

[3]) *Schäfer* und *Böhm*, Jahresber. über d. Fortschr. d. Tierchem. **3**, 363, 1872.

[4]) *R. Chittenden* und *S. E. Allen*, Transact. of the Connecticut Academy of Arts and Sciences **7**, I, S. 84, 1886.

[5]) *M. Ascher*, Arch. f. Verdauungskrankh. **14**, 629, 1908.

[6]) *L. Pincussohn*, diese Zeitschr. 8, 387, 1908.

[7]) *J. A. Smorodinzew*, Die Fermente des Pflanzen- und Tierreichs **3**, 93—94, 1922 (russisch).

Über die Wirkung von Antimonpräparaten auf die Pepsinverdauung sind wir in der einschlägigen Literatur auf keine Angaben gestoßen. Deshalb beschlossen wir, eine vergleichende Untersuchung des Einflusses einiger Arsen- und Antimonpräparate auf das Pepsin einzuleiten und hielten uns an *Gross*' [1]) Methode, welche es gestattet, mit Leichtigkeit festzustellen, ob ein gegebenes Präparat auf das Pepsin einwirkt und in was für Konzentrationen es seine Wirkung an den Tag legt [2]).

Tabelle I.

Vorversuche.

Nr.	Benennung des Reagenten	Konzentration des Ferments	Nr. der letzten durchsichtigen Probierröhrchen	Quantität der Pepsineinheiten	Bemerkungen
1	H_2O	Pepsin *Kahlbaum* 0,85 proz.	3	40	Pepsin *Kahlbaum* oder *Rossicum* 2 proz.
2	H_2O	Pepsin *Kahlbaum* 1,6 proz.	4	80	
3	H_2O	Pepsin *Kahlbaum* 2 proz.	5	160	1 g Pepsin { 25 ccm 1/10 HCl, 25 „ Glycerin
4	H_2O	Dasselbe	5	160	0,1 proz. Caseinlösung in HCl
5	H_2O	„	5	160	
6	H_2O	Pepsin *Rossicum* 2 proz.	5	160	30 proz. Natriumacetatlösung
7	H_2O	Dasselbe	5	160	
8	H_2O	„	5	160	

Tabelle II.

1. Weinsaures Kalium- und Antimondoppelsalz. 2. Antimonchlorid.

Nr.	Benennung des Reagenten	Konzentration des Reagenten	Konzentration des Ferments	Nr. der letzten durchsichtigen Probierröhrchen	Quantität der Pepsineinheiten
9	H_2O	—	Pepsin *Kahlbaum* 2 proz.	5	160
10	$C_4H_4O_6<^{K}_{SbO}$	n/25	Dasselbe	1	10
11	Dasselbe	n/50	„	3	40
12	„	n/50	„	3	40
13	„	n/100	„	5	160
14	„	n/100	„	5	160
15	„	n/125	„	5	160
16	„	n/125	„	5	160
17	$SbCl_3$	n/40	„	5	160
18	Dasselbe	n/40	„	5	160
19	„	n/25	„	5	160
20	„	n/25	„	5	160

[1]) *O. Gross*, Berl. klin. Wochenschr. 45, 643, 1908.

[2]) *J. A. Smorodinzew*, Russ. physiol. Journ. 4, 103, 1921; Die Fermente des Pflanzen- und Tierreichs, 3. Teil, S. 102, 1922.

Tabelle III.

1. Weinsaures Kalium- und Antimondoppelsalz. 2. Antimonchlorid.

Nr.	Benennung des Reagenten	Konzentration des Reagenten	Konzentration des Ferments	Nr. der ersten durchsichtigen Probierröhrchen	Verzögernde Konzentration		
					molekulare	proz. im Gemisch	Proz. Sb im Gemisch
			Pepsin 2 proz.				
21	H_2O	—	1 : 16	Alles verdaut	—	—	—
22	$C_4H_4O_6 \langle^{K}_{SbO}$	n/5	1 : 16	5	1/40	0.0336	0,0125
23	Dasselbe	n/5	1 : 16	5	1/40	0,0336	0,0125
24	„	n/25	1 : 16	3	1/50	0,0269	0,0101
25	$SbCl_3$	n/25	1 : 16	Alles verdaut	—	verzögert nicht	
26	Dasselbe	n/40	1 : 16	Dasselbe	—	„	„

Anmerkung: 1. Brechweinstein in n/80 bis n/50000 (0,0078- bis 0,000016proz.) Verdünnung beschleunigt die Verdauung des Caseins durch Pepsin nicht.

2. Antimontrichlorid n/25 bis n/2240 (0,016- bis 0,0015proz.) beschleunigt dieselbe auch nicht.

3. HCl n/40 bis n/1680 (0,0076- bis 0,0002proz.) und $C_4H_4O_6$ n/10 bis n/1280 (0,0625- bis 0,0005proz.) wirkt weder beschleunigend noch verzögernd.

Tabelle IV.

1. Arsensaures Natrium. 2. Arsenigsaures Natrium und Kalium.

Nr.	Benennung des Reagenten	Konzentration des Reagenten	Konzentration des Ferments	Nr. der letzten durchsichtigen Probierröhrchen	Quantität der Pepsineinheiten
27	H_2O	—	Pepsin *Kahlbaum* 2 proz.	5	160
28	Na_2HAsO_4	n/10	Dasselbe	3	40
29	Na_2HAsO_4	n/10	„	3	40
30	Na_2HAsO_3	n/10	„	3	40
31	Na_2HAsO_3	n/10	„	3	40
32	K_2HAsO_3	n/10	„	3	40
33	K_2HAsO_3	n/10	„	3	40

Unsere Versuche wurden teils mit *Grüblers* Casein angestellt, teils mit von Frau *L. K. Smorodinzew* aus Milch bereitetem Casein, wobei wir für letzteres ihr hier unseren Dank aussprechen.

Da wir infolge zeitweiliger Schwierigkeiten nicht die Möglichkeit hatten, uns andere wasserlösliche Antimonpräparate zu verschaffen, so waren wir genötigt, uns mit Antimontrichlorid zu begnügen, welches in einem Gemisch von Salz- und Weinsäure löslich ist. Um den Einfluß dieser Säure auf den Prozeß feststellen zu können, stellten wir parallele Versuche mit denselben an. Die hauptsächlichsten Resultate unserer Beobachtungen sind in den Tabellen I bis VI zusammengestellt.

Tabelle V.

1. Arsensaures Natrium. 2. Arsenigsaures Natrium und Kalium.

Nr.	Benennung des Reagenten	Konzentration des Reagenten	Konzentration des Ferments	Nr. der ersten durchsichtigen Probierröhrchen	Verzögernde Konzentration: molekulare	proz. im Gemisch	Proz. As im Gemisch
			Pepsin 2 proz.				
34	H_2O	—	1 : 16	Alles verdaut	—	—	—
35	Na_2HAsO_3	n/10	1 : 16	4	$^1/_{40}$	0,0118	0,0052
36	Na_2HAsO_3	n/10	1 : 16	4	$^1/_{40}$	0,0118	0,0052
37	K_2HAsO_3	n/10	1 : 16	4	$^1/_{40}$	0,01404	0,0052
38	K_2HAsO_3	n/10	1 : 16	4	$^1/_{40}$	0,01404	0,0052
39	Na_2HAsO_4	n/10	1 : 16	4	$^1/_{40}$	0,0129	0,0052
40	Na_2HAsO_4	n/10	1 16	4	$^1/_{40}$	0,0129	0,0052

Vergleichende Tabelle VI.

Benennung des Reagenten	Konzentration des Reagenten	Konzentration des Ferments	Nr. der ersten durchsichtigen Probierröhrchen	Verzögernde Konzentration: molekulare	proz. im Gemisch	Proz. As bzw. Sb im Gemisch
		Pepsin 2 proz.				
H_2O	—	1 : 16	Alles verdaut	—	—	—
$C_4H_4O_6<^{K}_{SbO}$	n/25	1 : 16	3	$^1/_{50}$	0,0269	0,0101
	n/5	1 : 16	5	$^1/_{40}$	0,0336	0,0125
Na_2HAsO_3	n/10	1 : 16	4	$^1/_{40}$	0,0118	0,0052
K_2HAsO_3	n/10	1 : 16	4	$^1/_{40}$	0,01405	0,0052
Na_2HAsO_4	n/10	1 : 16	4	$^1/_{40}$	0,0129	0,0052

Zusammenfassung.

1. Das Doppelsalz Kalium- und Antimontartrat (Brechweinstein), Natrium- und Kaliumarsenite, Natriumarseniate verzögern die Verdauung des Caseins durch Pepsin.

2. Die geringste verzögernde Molekularkonzentration für Brechweinstein $\left(C_4H_4O_6<^{K}_{SbO}\right)$ = n/50 bei einem Gehalt an 0,0101 Proz. Sb; für Na_2HAsO_3, K_2HAsO_3 und Na_2HAsO_4 = n/40 bei 0,0052 Proz. Gehalt an As.

3. Die minimalen Dosen n/80 bis n/10240 (0,0025 bis 0,000021 Proz.) dieser Präparate üben auf die verdauende Wirkung des Pepsins keinerlei Wirkung aus.

4. Die K- und Na-Ionen spielen in der verzögernden Wirkung der Arsenpräparate keine Rolle; folglich hängt diese nur von den Anionen ab.

5. Die Arseniate und Arsenite wirken auf gleiche Weise.

6. Zum Unterschiede von der Amylase[1]) wirkt Brechweinstein auf das Pepsin etwas schwächer als die Arsenpräparate.

7. n/25 bis n/2240 (0,016 bis 0,00015 proz.) $SbCl_3$ beeinflussen die fermentative Wirkung des Pepsins gar nicht.

8. Salzsäure in Konzentrationen n/40 bis n/1600 (0,0076- bis 0,0002proz.) wirkt auf die Arbeit des Pepsins weder beschleunigend noch verzögernd.

9. Weinsäure in 0,0625- bis 0,0005proz. Konzentrationen (n/10 bis n/1280) verzögert weder die Verdauung des Caseins durch Pepsin noch beschleunigt sie dieselbe.

10. Das Casein hat sich im Vergleich zum Ptyalin in bezug auf die untersuchten Arsen- und Antimonpräparate als viel weniger empfindlich erwiesen.

---

[1]) *J. A. Smorodinzew* und *Fr. E. Iliin,* diese Zeitschr. **141**, 297, 1923.

Zur Kenntnis des Benzoyl-methyl-carbinols und des Phenyl-acetyl-carbinols.

Von

K. v. Auwers und O. Jordan.

(Aus dem chemischen Institut der Universität Marburg.)

(Eingegangen am 17. Oktober 1923.)

In seinen wichtigen Arbeiten über *Carboligase* hat *Neuberg*[1]) mit seinen Schülern festgestellt, daß dieses Ferment *Benzaldehyd* und *Acetaldehyd*, der bei einem Gärungsprozeß entsteht — nicht fertigen Acetaldehyd — zu vereinigen vermag. Das Kondensationsprodukt fassen *Neuberg* und *Ohle* als *l-Phenyl-acetyl-carbinol*, $C_6H_5 . CH(OH) . CO . CH_3$, auf, für das sie auch die Formel $C_6H_5 . \underbrace{CH . C}_{O}(OH) . CH_3$ in Betracht ziehen. Nach den Beobachtungen der genannten Autoren geht der anfangs einheitliche Körper beim Stehen in ein Gemisch der racemischen Substanzen $C_6H_5 . CH(OH) . CO . CH_3$ und $C_6H_5 . CO . CH(OH) . CH_3$ über, wobei der Brechungsindex n_D^{20} von 1,5315 auf 1,5331 bis 1,5338 steigt.

Bei vergleichenden Versuchen über diese Verbindungen, die im folgenden der Kürze halber nach der Lage ihrer Carbonylgruppe meist als *α-Ketol* ($C_6H_5 . CO . CH(OH) . CH_3$, Benzoyl-methyl-carbinol) und *β-Ketol* ($C_6H_5 . CH(OH) . CO . CH_3$) bezeichnet werden sollen, kamen *Neuberg* und *Ohle* zu folgenden Ergebnissen:

Die Darstellung des *racemischen Phenyl-acetyl-carbinols* auf dem von *Carapelle*[2]) vorgezeichneten Wege:

$$C_6H_5 . CH_2 . CO . CH_3 \rightarrow C_6H_5 . CHBr . CO . CH_3 \rightarrow C_6H_5 . CH(O . Ac) . CO . CH_3 \rightarrow C_6H_5 . CH(OH) . CO . CH_3$$

führte zu einer Substanz, die nach 24 Stunden den Brechungsindex $n_D^{20} = 1,5331$ besaß und in verhältnismäßig geringer Ausbeute ein Thiosemicarbazon vom Schmelzpunkt 201,5° lieferte, in diesem Zustande also vermutlich ein Gemisch der beiden isomeren Ketole darstellte.

---

1) Diese Zeitschr. **115**, 282, 1921; **121**, 311, 1921; **127**, 327, 1922; **128**, 610, 1922.

2) G. **33**, II, S. 261, 1903.

Bei der Bereitung des *α-Ketols* auf dem analogen Wege:

$$C_6H_5.CO.CHBr.CH_3 \rightarrow C_6H_5.CO.CH(O.Ac).CH_3 \rightarrow C_6H_5.CO.CH(OH).CH_3$$

entstand ein Produkt, das anfangs den in der Literatur[1]) angegebenen Brechungsindex $n_D^{20} = 1{,}5368$ zeigte, jedoch sank dieser im Laufe einiger Tage auf 1,5338. Die Autoren nehmen daher an, daß auch dieses Ketol beim Aufbewahren zum Teil eine Umlagerung — wahrscheinlich infolge der Alkalinität des Glases — erleidet und aus beiden Isomeren dasselbe Gleichgewichtsgemisch entsteht. Auch das Verhalten des Ketols gegen Phenyl-magnesium-bromid führen die Autoren als Beweis für die Richtigkeit dieser Auffassung an.

Die Umlagerung der Isomeren ineinander soll in beiden Fällen über das *Dienol* $C_6H_5.C.(OH):C.(OH).C_6H_5$ führen; zu welchem der beiden Ketole das oben erwähnte *Thiosemicarbazon* gehört, lassen *Neuberg* und *Ohle* zunächst offen, weisen es aber später, ebenso wie ein *Semicarbazon* vom Schmelzpunkt 194°, dem *β-Ketol* zu.

An den im vorstehenden skizzierten Ergebnissen der Versuche von *Neuberg* und *Ohle* erschien uns die Annahme auffallend, daß das α-Ketol bei gewöhnlicher Temperatur freiwillig zum großen Teil in die isomere β-Verbindung übergehe, denn dieser Vorgang stellt die Umwandlung eines konjugierten Systems in ein nicht konjugiertes dar, während Verschiebungen von Doppelbindungen sich in der Regel in umgekehrtem Sinne vollziehen.

Wir hatten daher den Wunsch, diese Verhältnisse aus eigener Anschauung kennenzulernen und berichten im folgenden kurz über unsere Beobachtungen, die in manchen Punkten von denen der mehrfach genannten Forscher abweichen.

Wir haben zunächst das *α-Ketol* zweimal auf dem bereits früher von *Auwers* und später von *Neuberg* und *Ohle* eingeschlagenen Wege dargestellt, letzten Endes also durch Verseifung der Acetylverbindung $C_6H_5.CO.CH(O.Ac).CH_3$ mit Bariumcarbonat und siedendem Wasser. Da es denkbar war, daß das hierbei erforderliche längere Kochen mit Wasser eine atomistische Verschiebung hervorrufen könne, wurde ein drittes Präparat durch achttägiges Schütteln einer alkoholisch-wässerigen Lösung von α-Brom-propiophenon, $C_6H_5.CO.CHBr.CH_3$, mit Silberoxyd, also unter möglichst milden Bedingungen, bereitet. Von den einzelnen Präparaten bestimmte man, nachdem sie mehrfach im Vakuum destilliert worden waren, den Brechungsindex, bewahrte sie dann in zugeschmolzenen Röhrchen aus gewöhnlichem Glase auf und wiederholte von Zeit zu Zeit die Bestimmungen. Hierbei wurden die Präparate teils in ihrem augenblicklichen Zustande, teils nach

---

[1]) *Auwers*, B. 50, 1180, 1917.

erneuter Vakuumdestillation untersucht, doch ergaben sich hierbei in keinem Falle irgendwelche nennenswerten Unterschiede.

Einen Überblick über die wesentlichen Beobachtungen gibt die folgende kleine Zusammenstellung.

Alter	1	2	3
Frisch dargestellt . . . . . n_D^{20} =	1,5406	1,5366	1,5370
4 Tage . . . . „	1,5388	1,5306	1,5370
4 Wochen . . . . „	1,5396	—	1,5370
8 Wochen . . . . „	1,5395	1,5366	—

Um zu prüfen, ob Alkalien oder Säuren umlagernd wirken können, haben wir eine Probe des Präparates 2, das wir glaubten als das reinste ansehen zu dürfen, in ätherischer Lösung 5 Stunden mit reiner verdünnter Natronlauge geschüttelt und eine andere Probe in gleicher Weise mit verdünnter Salzsäure behandelt. Bei dem zweiten Versuch blieb das Ketol gänzlich unverändert, denn n_D^{20} war 1,5366; beim ersten war ein kleiner Teil durch das Alkali gespalten worden, denn es hatte sich in geringer Menge eine *Säure* gebildet, die in rohem Zustande bei 112 bis 116° schmolz, also vermutlich nicht ganz reine *Benzoesäure* war. Der unangegriffene Ketonalkohol zeigte nach der Destillation im Vakuum den Index n_D^{20} = 1,5357 und behielt ihn auch bei mehrtägigem Stehen bei.

Dieses Ketol wurde alsdann durch Acetylchlorid in sein *Acetat* zurückverwandelt, das in Dichte und Brechungsindizes mit dem früher von dem einen von uns beschriebenen Präparat übereinstimmte. Zum Schluß verseifte man diese Acetylverbindung nochmals zum Ketol und erhielt ein Präparat von n_D^{20} = 1,5361, also wiederum die altbekannte Verbindung.

Wir haben somit bei unseren zahlreichen Versuchen niemals die von *Neuberg* und *Ohle* auf Grund ihrer Beobachtungen vermutete partielle Umlagerung des α-Ketols beobachten können, haben vielmehr den Eindruck gewonnen, daß diese Substanz unter den verschiedensten Bedingungen ein recht beständiger Körper ist.

Aus den von uns hergestellten Präparaten des α-Ketols haben wir in verschiedenen Altersstadien der Proben *Semicarbazone* und *Thiosemicarbazone* dargestellt, die rasch und meist in sehr guter Ausbeute entstanden und die von jenen Autoren angegebenen Schmelzpunkte 193 bis 194° und 200 bis 207° — je nach der Schnelligkeit des Erhitzens — besaßen. Da das besprochene Ketol unserer Ansicht nach das reine α-Derivat ist, und bei der Umsetzung mit jenen Ketonreagenzien, die sich unter milden Bedingungen vollzieht, keine Umlagerung zu be-

fürchten ist, glauben wir im Gegensatz zu *Neuberg* und *Ohle* jenen Verbindungen die Formeln

$$\underset{\overset{\|}{N}.NH.CO.NH_2}{C_6H_5.C.CH(OH).CH_3} \quad \text{und} \quad \underset{\overset{\|}{N}.NH.CS.NH_2}{C_6H_5.C.CH(OH).CH_3}$$

zulegen zu dürfen. Wider Erwarten ist es uns allerdings nicht gelungen, aus diesen Substanzen mit Sicherheit das α-Ketol zu regenerieren, denn bei der Spaltung mit Schwefelsäure oder Oxalsäure traten Nebenreaktionen auf, so daß die Menge des schließlich erhaltenen Öles für eine genaue Untersuchung nicht ausreichte.

Im Anschluß an diese Versuche haben wir uns mit dem Produkt beschäftigt, das bei der gemäßigten Oxydation des *Methylphenyläthylenglykols* nach *Zincke* und *Zahn*[1]) entsteht. Diese Forscher hatten in dem Körper das β-Ketol vermutet, während der eine von uns es trotz einiger Abweichungen in der Konstanten für identisch mit dem α-Ketol erklärt hatte, da sein Semicarbazon und p-Nitrophenylhydrazon identisch mit den aus der α-Verbindung gewonnenen Präparaten waren.

Unsere Versuche, auf deren Einzelheiten wir nicht eingehen, lehrten, daß regelmäßig *Gemische der beiden Isomeren* entstehen, deren glatte Trennung uns nicht gelang. Beispielsweise bemühten wir uns, das Gemisch durch kurzes Schütteln mit Natriumbisulfit zu zerlegen, und konnten auf diesem Wege Proben mit verschiedenen Brechungsindizes gewinnen, doch hätte günstigstenfalls nur eine oftmalige Wiederholung dieses Verfahrens zum Ziele geführt, wozu die vorhandenen Mengen nicht ausreichten. Aus der verhältnismäßig reichlichen Bildung des Thiosemicarbazons vom Schmelzpunkt 200 bis 207°, die bis zu 60 Proz. des Thiosemicarbazons betrug, war zu schließen, daß in den Gemischen das α-Derivat überwog.

Für die Darstellung des *β-Ketols* gingen wir von dem üblichen Ausgangsmaterial, dem *Benzyl-methylketon* aus, suchten aber das langwierige *Metzner*sche Verfahren[2]) durch ein kürzeres zu ersetzen. Wir stellten zu diesem Zweck aus Phenylacetaldehyd und Magnesiumbrommethyl das Benzyl-methyl-carbinol, $C_6H_5 . CH_2 . CH(OH) . CH_3$, dar und versuchten dieses durch vorsichtige Oxydation in das gewünschte Keton überzuführen. Bei der Behandlung des Carbinols mit *Beckmann*schem Gemisch entstanden aber selbst bei Eiskälte regelmäßig erhebliche Mengen von *Benzaldehyd*, die sich nicht in einfacher Weise abtrennen ließen. Salpetersäure lieferte unter den verschiedensten Bedingungen auch keine befriedigenden Ausbeuten an Keton, da die Oxydation gleichfalls zu weit — bis zur Bildung von Oxalsäure — ging. Umgekehrt vermochte Mercuriacetat selbst bei tagelangem Kochen nur geringe Mengen Carbinol in das Keton zu verwandeln. So mußten

[1]) B. 43, 855, 1910. — [2]) A. 298, 374, 1897.

wir schließlich die Verbindung doch nach den Angaben von *Metzner* aus Phenacetyl-malonester bereiten.

Bei einem Vorversuch erhielten wir nach dem *Carapelle*schen Verfahren aus dem Phenyl-aceton ein *Ketol*, das überraschenderweise eine *ziemlich kräftige Exaltation* besaß, also zum mindesten teilweise aus der *α-Verbindung* bestehen mußte. Wir haben darauf schrittweise die Zwischenprodukte untersucht, um festzustellen, an welcher Stelle des Weges eine Umlagerung eintritt, die spektrochemisch leicht zu erkennen sein mußte.

Die *Bromierung* des Phenyl-acetons führte man im Sonnenlicht in Chloroformlösung aus. Da das Bromderivat auch unter vermindertem Druck nicht ganz unzersetzt destillierte, reinigte man ein neues Präparat nur durch sorgfältiges Waschen mit Wasser und Trocknen. Das fast farblose Öl besaß den richtigen Bromgehalt und erwies sich als optisch normal, entsprach also der Formel $C_6H_5 . CHBr . CO . CH_3$.

Kaliumacetat verwandelte das Bromid in absolut-alkoholischer Lösung in ein *Acetat*, das ebenso wie das beim Vorversuch gewonnene Präparat in seinen physikalischen Konstanten der früher von *Auwers* aus α-Brom-propiophenon erhaltenen Verbindung $C_6H_5.CO.CH(O.Ac).CH_3$ ähnelte. Eine nochmalige Wiederholung des Versuches führte zu keinem anderen Ergebnis. Auch als das entsprechende *Jodid* mit Silberacetat in Eisessig umgesetzt wurde, entstand ein Produkt von ungefähr gleichen Eigenschaften.

Um diese Präparate direkt mit unzweifelhaftem *α-Ketol-acetat* vergleichen zu können, stellte man eine Probe dieser Verbindung durch Digestion von reinem α-Ketol mit Acetylchlorid dar. In der folgenden Zusammenstellung ist dieses Präparat mit 5 bezeichnet. Die Werte unter 6 sind den Literaturangaben über die α-Verbindung entnommen; die Präparate 1 bis 4 wurden aus dem bromierten und jodierten Phenyl-aceton gewonnen.

Präparat	d_n^{20}	n_D^{20}	$E\Sigma_\alpha$	$E\Sigma_D$	$E\Sigma_\beta - \Sigma_\alpha$
1	1,108	1,5153	+ 0,60	+ 0,62	+ 23 Proz.
2	1,110	1,5161	+ 0,62	+ 0,65	+ 26 „
3	1,106	1,5140	+ 0,59	+ 0,61	+ 22 „
4	1,110	1,5151	+ 0,58	+ 0,59	+ 18 „
5	1,109	1,5168	+ 0,65	+ 0,68	+ 31 „
6	1,112	1,5155	+ 0,53	+ 0,55	+ 26 „

Die Werte schwanken ziemlich und deuten darauf hin, daß nicht alle Präparate ganz einheitlich waren; aber sie lassen keinen Zweifel darüber, daß sie sämtlich zum mindesten der Hauptsache nach aus *α-Ketol-acetat* bestanden, denn die isomere β-Verbindung dürfte nur in der Dispersion schwache Exaltationen aufweisen.

Die Präparate glichen sich auch darin, daß sie *indifferent* gegen *Semicarbazid* und *Thiosemicarbazid* waren. Auch dies spricht für die Strukturformel $C_6H_5 . CO . CH(O . Ac) . CH_3$, da die Reaktionsfähigkeit des Carbonyls durch die benachbarten großen Gruppen beeinträchtigt werden kann. Mit *p-Nitrophenylhydrazin* lieferten Präparate verschiedener Herkunft langsam erstarrende, rötliche Produkte, die sich mit verdünntem Alkohol, wenn auch nur schlecht, reinigen ließen und bei 115 bis 118^0 bzw. 118 bis 120^0 schmolzen. Mischproben zeigten keine Schmelzpunktserniedrigung.

Die Umwandlung des Bromids oder Jodids vom Benzyl-methylketon in das Acetat kommt also nicht durch einen einfachen Austausch zustande, sondern es spielt sich dabei eine Zwischenreaktion ab. Man könnte etwa an folgenden Verlauf denken:

$$\underset{\text{Br} + \text{K . O . CO . CH}_3}{C_6H_5\text{—CH—CO—CH}_3} \rightarrow C_6H_5\text{—}\overset{}{\underset{|}{\text{CH}}}\text{—CO—CH}_3 \rightarrow C_6H_5\text{—CH—C—CH}_3\ (\diagdown O \diagup \diagdown)$$

$$\rightarrow C_6H_5\text{—CH—C—CH}_3\ (\diagdown O \diagup \diagdown O . COCH_3) \rightarrow C_6H_5\text{—CO—}\underset{\text{O . COCH}_3}{\text{CH}}\text{—CH}_3 .$$

Oder es könnte das als intermediäres Produkt angenommene Oxyd in ein Enol übergehen, an dessen freie Valenz sich dann das Anion anlagert, worauf schließlich wieder die Ketoform hergestellt wird:

$$C_6H_5\text{—CH—C—CH}_3\ (\diagdown O \diagup \diagdown) \rightarrow C_6H_5\text{—}\underset{\text{OH}}{\text{C}}\text{=}\underset{|}{\text{C}}\text{—CH}_3 \rightarrow C_6H_5\text{—}\underset{\text{OH}}{\text{C}}\text{=}\underset{\text{O.COCH}_3}{\text{C}}\text{—CH}_3$$

$$\rightarrow C_6H_5\text{—CO—}\underset{\text{O . COCH}_3}{\text{CH}}\text{—CH}_3 .$$

Wir haben versucht, ein solches Dienol-derivat zu fassen, indem wir das bromierte Phenyl-aceton mit Natriumacetat und Essigsäureanhydrid behandelten, wobei eine Diacetylverbindung jenes Dienols hätte entstehen können. Das erhaltene Produkt entfärbte jedoch nicht Brom, während die von *Thiele*[1]) gewonnenen Stilbendiol-diacetate $C_6H_5 . C(O\,Ac) : C(O\,Ac) . C_6H_5$, wenn auch langsam, Brom aufnehmen.

Auch ein Versuch, in Nachahmung des *Thiele*schen Verfahrens zur Darstellung der Stilbendiol-acetate eine entsprechende Verbindung durch Reduktion von *Acetyl-benzoyl*, $C_6H_5 . CO . CO . CH_3$, mit Zinkstaub in Gegenwart von Essigsäureanhydrid zu gewinnen, schlug fehl, denn auch die hierbei entstandene Substanz reagierte weder mit Brom noch mit Permanganat.

Wir möchten daher glauben, daß sich die fragliche Umlagerung eher nach dem ersten als nach dem zweiten Schema vollzieht. Dabei

---

[1]) A. **306**, 143, 1899.

könnte sich übrigens primär das normalerweise zu erwartende β-Ketol-acetat bilden, das sich dann im Sinne der Formeln

$$\underset{\text{O.COCH}_3}{C_6H_5\text{—CH—CO—CH}_3} \rightarrow C_6H_5\text{—CH—C—CH}_3\ (\text{—O—}, \text{O.COCH}_3) \rightarrow \underset{\text{O.COCH}_3}{C_6H_5\text{—CO—CH—CH}_3}$$

in die isomere Verbindung umlagert; ähnlich wie *Milchsäurealdehyd-acetat* beim Kochen mit Methylalkohol oder Wasser *Acetol*, $CH_3.CO.CH_2.OH$, liefert[1]). Auch die Entstehung des Acetols bei der Einwirkung von Kaliumacetat auf *α-Brompropionaldehyd* ist ein analoger Vorgang[1]).

Wurde das Acetat aus dem Bromid in alkoholischer Lösung hergestellt, so erhielt man regelmäßig in ziemlich beträchtlicher Menge eine Substanz, die wesentlich tiefer überging, aber nicht auf einen konstanten Siedepunkt gebracht werden konnte. Eine Analyse stimmte annähernd auf die Formel $C_{11}H_{14}O_2$. Danach war das Produkt vielleicht ein *Ketol-äthyläther*, $C_6H_5.CO.CH(OC_2H_5).CH_3$, oder $C_6H_5.CH(OC_2H_5).CO.CH_3$. Die spektrochemischen Konstanten sprachen für die zweite Formel, doch müssen wir es offen lassen, ob wirklich diese Verbindung vorlag. Ein Versuch, die fragliche Verbindung durch Kochen des Bromids mit absolutem Alkohol unter Zusatz von Calciumcarbonat zu gewinnen, führte nicht zum Ziel.

Die *Verseifung* der aus halogeniertem Phenylaceton gewonnenen Präparate von Ketol-acetat durch kochendes Wasser und Bariumcarbonat bestätigte, daß diese Produkte im wesentlichen α-Verbindung enthielten, jedoch nicht in reinem Zustande, denn die Werte für d_4^{20} schwankten zwischen 1,091 und 1,103, und für n_D^{20} wurde 1,5328 und 1,5347 gefunden. Je sorgfältiger die Präparate durch mehrfache Rektifikation gereinigt waren, um so höher waren Dichte und Brechungsindex. Wir halten es für wahrscheinlich, daß die Beimengungen nicht aus dem isomeren β-Ketol bestanden, sondern daß die Präparate noch gewisse Mengen der oben besprochenen Substanz des Vorlaufs zurückhielten, für die $d_4^{20} = 1{,}040$ und $n_D^{20} = 1{,}5067$ war.

Da das gesuchte *β-Ketol* über das Acetat nicht zu erhalten war, haben wir schließlich noch versucht, vom *Brom-* oder *Jod-benzyl-methyl-keton* aus unmittelbar zu ihm zu gelangen, indem wir diese Halogenderivate mit Silberoxyd behandelten. Aus dem Jodid entstand ein inkonstant siedendes Gemisch, aus dem keine bestimmte Verbindung isoliert werden konnte. Dagegen wurde bei einem der mit dem *Bromid* angestellten Versuche eine Substanz gewonnen — allerdings nur in schlechter Ausbeute —, die unter 14 mm Druck konstant bei 125,5 bis 128° siedete, die Zusammensetzung eines Ketols besaß und einheitlich zu sein schien. Mit der Struktur des β-Ketols waren

[1]) *Nef*, A. **335**, 249, 266, 1904.

jedoch die spektrochemischen Konstanten des Körpers nicht zu vereinigen, vielmehr deuteten sie darauf hin, daß ein Körper von der Formel

$$C_6H_5-CH-C-CH_3 \quad \text{oder} \quad C_6H_5-C-CH-CH_3$$
$$\diagdown O \diagup \diagdown OH \qquad HO \diagup \diagdown O \diagup$$

vorliegen könne.

	$E\Sigma_\alpha$	$E\Sigma_D$	$E\Sigma_\beta - \Sigma_\alpha$
Berechnet für $C_9H_{10}O'O''\|^{=}_3$ (Ketol) .	— 0,41	— 0,41	+ 18 Proz.
„ „ $C_9H_{10}O'O^{<}\|^{=}_3$ (Oxyd) .	— 0,05	— 0,03	+ 25 „

Für das β-Ketol würden Depressionen des Brechungsvermögens unverständlich sein; dagegen sind sie, wie kürzlich[1]) nachgewiesen wurde, eine regelmäßige Eigentümlichkeit von *Acetalen* und *Halbacetalen*. Die $E\Sigma$-Werte der Refraktion stimmen gut zu den oben gegebenen Formeln; die Erhöhung der Dispersion erscheint allerdings, auch unter Berücksichtigung des Einflusses der Phenylgruppe, zu hoch, doch mag dies mit der Beschaffenheit des Präparates, von dem nur eine geringe Menge zur Verfügung stand, zusammenhängen.

Für die angenommene Konstitution spricht auch der Umstand, daß der Körper mit Semicarbazid nicht reagierte.

Im Gegensatz zu dem ohne Schwierigkeit erhältlichen und beständigen α-Ketol scheint daher die β-Verbindung eine Neigung zur Umlagerung zu besitzen, die entweder zur isomeren α-Verbindung oder zu einem Halbacetal führen kann. Es ist dies bemerkenswert, da nach den bisherigen Beobachtungen Oxyketone verschiedener Art im allgemeinen als solche bestehen und sich nicht oder nur unter besonderen Bedingungen, in zyklische Isomere verwandeln. So ist beispielsweise *Kling*[2]) auf Grund einer ausgedehnten Untersuchung über das *Acetol* zu dem Ergebnis gekommen, daß dieser Körper das *Oxyaceton* ist und nur in Lösungen sich zur oxydischen Verbindung $CH_3.C-CH_2$ ($HO \diagup \diagdown O \diagup$) isomerisieren kann. Desgleichen hat der eine von uns (a. a. O.) auf spektrochemischem Wege wahrscheinlich gemacht, daß der δ-*Acetobutylalkohol* die diesem Namen entsprechende Konstitution besitzt, während der γ-*Oxyvaleraldehyd* und der δ-*Oxycapronaldehyd* in Wirklichkeit hydroxylierte Oxyde sind. Vielleicht ist das anscheinend abweichende Verhalten des β-Ketols auf die Phenylgruppe zurückzuführen.

Ob bei der biochemischen Synthese des β-Ketols dessen Keton- oder Halbacetalform entsteht, läßt sich auf Grund der bisher über diese Substanz vorliegenden Angaben nicht entscheiden. Da aber

[1]) *Auwers*, B. **56**, 1677, 1923.
[2]) A. ch. (8) **5**, 471, 1905.

Neuberg und *Ohle* aus ihren Gemischen stets nur das Semicarbazon und Thiosemicarbazon erhielten, das nach unseren Beobachtungen zum α-Ketol gehört, scheint auch ihr β-Ketol nicht von Ketonreagenzien angegriffen worden zu sein; eine gewisse Wahrscheinlichkeit spricht also dafür, daß es ein Halbacetal gewesen ist. Sicher würde sich die Frage vermutlich durch eine vollständige spektrochemische Untersuchung eines auf biochemischem Wege erhaltenen Präparats lösen lassen.

Nicht ohne weiteres zu erklären ist vorläufig der Gegensatz zwischen den *Neuberg-Ohle*schen und unseren Beobachtungen über die Beständigkeit des *α-Ketols*. Man könnte sich versucht fühlen, die Hypothese aufzustellen, daß in einem biochemischen Arbeitsraum Keime in der Luft eine Umlagerung auslösen können, die in einem chemischen Laboratorium mangels solcher Keime ausbleibt, ähnlich wie der freiwillige Übergang gewisser labiler Indazolderivate in ihre stabilen Formen durch Keimwirkung bedingt ist[1]. Wir müssen es jedoch den sachverständigen Biochemikern überlassen, zu prüfen, ob diese Vermutung haltbar ist. Aus diesem Grunde glaubten wir, unsere Beobachtungen trotz ihrer Lückenhaftigkeit veröffentlichen zu sollen.

Experimentelles.

Der Raumersparnis halber beschränken wir uns in der Hauptsache auf die Wiedergabe der physikalischen Daten einiger Präparate und teilen über die Darstellung der Substanzen nur das Notwendigste mit. Nähere Angaben finden sich meist an den angeführten Literaturstellen.

Der Brechungsindex für gelbes Licht wurde in der Regel mit einer Heliumröhre bestimmt. Aus den so gefundenen Werten von n_{He} wurde dann n_D berechnet, nachdem durch einige vergleichende Beobachtungen mit Natriumlicht der Unterschied zwischen n_{He} und n_D festgestellt war.

Benzoyl-methyl-carbinol (α-Ketol).

Als Beispiel für die vollständige spektrochemische Untersuchung eines Präparates mögen folgende Beobachtungsreihen dienen.

1. Präparat aus α-Brompropiophenon nach *Auwers*; unmittelbar nach der Darstellung untersucht.

2. Dasselbe Präparat nach 4 Tagen; frisch destilliert.

3. Dasselbe Präparat nach 14 Tagen; nicht destilliert.

1. $Sp._{7,5} = 116$ bis $116,5^0$. $d_4^{15,9} = 1,1091$. $n_\alpha = 1,53764$. $n_D = 1,54268$. $n_\beta = 1,55578$ bei $15,9^0$.

2. $Sp._{12} = 123$ bis $123,5^0$. $d_4^{13,7} = 1,1111$. $n_\alpha = 1,53666$. $n_D = 1,54171$. $n_\beta = 1,55485$ bei $13,7^0$.

3. $d_4^{12,0} = 1,1129$. $n_\alpha = 1,53813$. $n_D = 1,54326$. $n_\beta = 1,55640$ bei $12,0^0$.

---

[1]) *Auwers* und *Lange*, B. 55, 1154, 1922.

	M_α	M_D	$M_\beta - M_\alpha$
Berechnet für $C_9H_{10}O'O''\|\overline{}_3$ (150,08)	41,41	41,70	0,93
Gefunden 1	42,30	42,63	1,18
Gefunden 2	42,16	42,49	1,19
Gefunden 3	42,19	42,52	1,18
EM (Mittel)	+ 0,81	+ 0,85	+ 0,25
EΣ "	+ 0,54	+ 0,57	+ 27 Proz.

Als das Präparat nach einigen weiteren Wochen nochmals untersucht wurde, erwies sich der Brechungsindex für Natriumlicht als unverändert.

Das *Thiosemicarbazon* des Körpers wurde in Pyridin dargestellt (vgl. *Neuberg* und *Ohle*, diese Zeitschr. **128**, 616, 1922); das *Semicarbazon* in wässerig-alkoholischer Lösung. Die Ausbeute war in beiden Fällen fast quantitativ, die Schmelzpunkte entsprachen den Literaturangaben.

Zur *unmittelbaren Darstellung des α-Ketols aus dem α-Brom-propiophenon* schüttelte man 5 g des gebromten Ketons in wässerigem Alkohol bei gewöhnlicher Temperatur mit der äquivalenten Menge Silberoxyd. Nach 2 Tagen gab man noch $^3/_4$ Molg. Silberoxyd und ein Kriställchen Jodkalium hinzu. Nach 6 Tagen unterbrach man den Versuch, arbeitete auf und rektifizierte zum Schluß das Reaktionsprodukt im Vakuum. Der Siedepunkt lag unter 19 mm Druck bei 130°. Die Ausbeute betrug etwa 1 g.

Der Wert von $n_D^{20} = 1{,}5374$ für dieses Präparat blieb im Laufe von 4 Wochen konstant.

Für die Präparate des α-Ketols, die *durch Oxydation des Methyl-phenyläthylenglykols* gewonnen und zum Teil weiter gereinigt worden waren, geben wir nicht die vollständigen Beobachtungsreihen, sondern nur die Werte für n_D^{20} an.

Ursprüngliches Präparat	1,5324
Teil, der nicht mit Bisulfit reagierte	1,5342
Aus der Bisulfitverbindung abgeschieden	1,5350

Das ursprüngliche Präparat lieferte das bekannte *Thiosemicarbazon* in einer Ausbeute von etwa 30 Proz. d. Th., bei dem Teil, der nicht mit Bisulfit reagiert hatte, betrug sie etwa 45 Proz., doch haben diese Zahlen keinen Anspruch auf Genauigkeit. Sie zeigen nur, ebenso wie die Indizes, daß kein reines α-Ketol vorlag.

Benzyl-methyl-keton.

Folgende Konstanten wurden bestimmt:

$\text{Sp.}_{13} = 99{,}5^0$. $d_4^{22,9} = 1{,}0044$. $d_4^{20} = 1{,}008$. $n_\alpha = 1{,}50956$. $n_D = 1{,}51393$. $n_\beta = 1{,}52451$ bei 22,9°. $n_D^{20} = 1{,}5142$.

	M_α	M_D	$M_\beta - M_\alpha$
Berechnet für $C_9H_{10}O''\|\overline{}_3$ (134,08)	39,89	40,17	0,92
Gefunden	39,90	40,18	0,98
EM	+ 0,01	+ 0,01	+ 0,06
EΣ	+ 0,01	+ 0,01	+ 7 Proz.

Benzyl-methyl-carbinol.

Eine absolut ätherische Lösung von frisch destilliertem Phenylacetaldehyd ließ man zu Magnesiumbrommethyl in Äther tropfen und arbeitete in der üblichen Weise auf. *Errera*[1]) erhielt den Körper durch Reduktion von Phenyl-aceton.

$Sp._{11}$ = 101 bis 102°. $d_4^{14,5} = 0,9988$. $d_4^{20} = 0,994$. $n_\alpha = 1,52017$. $n_D = 1,52425$. $n_\beta = 1,53453$. $n_\gamma = 1,54355$ bei 14,5°.

	M	M_D	$M_\beta - M_\alpha$	$M_\gamma - M_\alpha$
Berechnet für $C_9H_{12}O' \vdash_3$ (136,10)	41,40	41,69	0,92	1,47
Gefunden	41,45	41,72	0,95	1,55
EM	+ 0,05	+ 0,03	+ 0,03	+ 0,08
$E\Sigma$	+ 0,04	+ 0,02	+ 8 Proz.	+ 5 Proz.

α-Brombenzyl-methyl-keton.

Während des Eintropfens des Broms in die chloroformische Lösung des Ausgangsmaterials saugte man den entstehenden Bromwasserstoff ab. Nach der Entfernung des Chloroforms nahm man den Rückstand in Äther auf, wusch mit ganz schwach sodahaltigem Wasser, trocknete und entfernte die letzten Spuren von Äther durch anhaltendes Durchsaugen von trockener Luft.

0,2208 g Substanz: 10,20 ccm n/10 $AgNO_3$.

C_9H_9OBr: Ber. Br 37,5; gef. Br 36,9.

$d_4^{15,1} = 1,4514$. $d_4^{20} = 1,446$. $n_\alpha = 1,56186$, $n_D = 1,56696$, $n_\beta = 1,58026$ bei 15,1°. $n_D^{20} = 1,5648$.

	M_α	M_D	$M_\beta - M_\alpha$
Berechnet f. $C_9H_9O''Br \vdash_3$ (212,98)	47,48	47,81	1,10
Gefunden	47,58	47,93	1,30
EM	+ 0,10	+ 0,12	+ 0,20
$E\Sigma$	+ 0,05	+ 0,06	+ 18 Proz.

Die $E\Sigma$-Werte zeigen, daß ein Körper ohne „aktive" Konjugation vorliegt, die Bromierung also ohne sonstige Änderungen im Molekül verlaufen ist.

Ketol-acetat.

1. 10 g des beschriebenen Bromids wurden mit 10 g Kaliumacetat in absolutem Alkohol 2 Stunden unter Rückfluß gekocht. Nach dem Erkalten goß man in Wasser, nahm das ausgeschiedene Öl in Äther auf, trocknete und rektifizierte im Vakuum. Die Substanz ging nach mehrfacher Destillation unter 10 mm Druck bei 135 bis 136° über; das entspricht ungefähr dem Siedepunkt des *α-Ketol-acetats*, der unter 17 mm Druck bei 143 bis 147° gefunden wurde.

0,2020 g Substanz: 0,5101 g CO_2, 0,1145 g H_2O.

$C_{11}H_{12}O_3$: Ber. C 68,7, H 6,3; gef. C 68,9, H 6,3.

2. und 3. Zwei Präparate, die in gleicher Weise dargestellt wurden, siedeten unter 28 mm Druck bei 160 bis 164° bzw. 160,5 bis 161°.

[1]) G. **16**, 315, 1886.

4. Um das Bromid in das entsprechende *Jodid* zu verwandeln, versetzte man es in trockenem Aceton mit etwas mehr als der äquivalenten Menge Jodnatrium im gleichen Mittel, wobei sich sofort Bromnatrium abschied. Nach 15 Minuten filtrierte man ab, goß in Wasser, schüttelte die ätherische Lösung des Reaktionsproduktes mit Thiosulfat und verjagte den Äther. Das Jodid hinterblieb als schweres, gelbliches Öl.

17 g Jodid wurden in Eisessig 5 Stunden mit der äquimolekularen Menge Silberacetat gekocht. Man arbeitete in der gebräuchlichen Weise auf und destillierte das Reaktionsprodukt mehrfach. Der höher siedende Anteil, der unter 40 mm Druck bei 166 bis 169° überging, bestand aus Acetat.

5. *α-Ketol* wurde durch einstündiges Erwärmen mit Acetylchlorid auf dem Wasserbade in sein Acetylderivat verwandelt. Nach der Reinigung siedete das Präparat unter 14 mm Druck bei 138 bis 140°.

1. $d_4^{14,6} = 1,1131$. $n_\alpha = 1,51324$. $n_D = 1,51774$. $n_\beta = 1,52908$ bei 14,6°.
2. $d_4^{24,7} = 1,1057$. $n_\alpha = 1,50950$. $n_D = 1,51400$. $n_\beta = 1,52552$ bei 24,7°.
3. $d_4^{15,1} = 1,1109$. $n_\alpha = 1,51177$. $n_D = 1,51621$. $n_\beta = 1,52746$ bei 15,1°.
4. $d_4^{20,2} = 1,1097$. $n_\alpha = 1,51076$. $n_D = 1,51506$. $n_\beta = 1,52597$ bei 20,2°.
5. $d_4^{16,5} = 1,1124$. $n_\alpha = 1,51391$. $n_D = 1,51842$. $n_\beta = 1,53077$ bei 16,5°.

	M_α	M_D	$M_\beta - M_\alpha$
Berechnet f. $C_{11}H_{12}O{<}O''{\mid}^{=}_3$ (192,10)	50,73	51,07	1,09
Gefunden 1	51,89	52,27	1,34
Gefunden 2	51,92	52,31	1,37
Gefunden 3	51,87	52,25	1,33
Gefunden 4	51,84	52,21	1,29
Gefunden 5	51,98	52,37	1,43

Als man Präparate des Acetats bis zu mehreren Wochen bei 40° der Einwirkung von *Semicarbazid* aussetzte, trat keine Umsetzung ein. Auch mit *Thiosemicarbazid* reagierte es nicht. Dagegen entstanden bei der Digestion mit *salzsaurem p-Nitrophenylhydrazin* in wässerig-alkoholischer Lösung aus den verschiedenen Proben ölige Produkte, die meist im Laufe von Tagen oder Wochen erstarrten und unscharf bei Temperaturen zwischen 115 und 120° schmolzen.

Die Vorläufe, die bei der Darstellung des Acetats aus dem Bromid abgefallen waren, wurden mehrfach rektifiziert; die Hauptmenge siedete schließlich unter 40 mm Druck bei 130 bis 133°. Das farblose Öl lieferte bei der Analyse Werte, die annähernd auf die Formel eines *Ketol-äthyl-äthers* stimmten.

0,1463 g Substanz: 0,4000 g CO_2, 0,0971 g H_2O.

$C_{11}H_{14}O_2$: Ber. C 74,1, H 7,9; gef. C 74,6, H 7,4.

$d_4^{25,4} = 1,0249$. $d_4^{20} = 1,040$. $n_\alpha = 1,50010$. $n_D = 1,50424$. $n_\beta = 1,51497$ bei 25,4°. $n_D^{20} = 1,5066$.

	M_α	M_D	$M_\beta - M_\alpha$
Berechnet für $C_{11}H_{14}O{<}O''{\mid}^{=}_3$	50,72	51,05	1,08
Gefunden	51,12	51,48	1,28
EM	+ 0,40	+ 0,43	+ 0,20
EΣ	+ 0,22	+ 0,42	+ 19 Proz.

Versuche zur Darstellung des β-Ketols.

Die aus dem Bromid erhaltenen Präparate von Ketol-acetat wurden in der üblichen Weise verseift. Zwei Präparate des so gewonnenen Carbinols untersuchte man optisch; das eine wurde auch analysiert.

0,1947 g Substanz: 0,5111 g CO_2, 0,1242 g H_2O.
$C_9H_{10}O_2$: Ber. C 72,0, H 6,7; gef. C 71,6, H 7,1.

1. $Sp._{11}$ = 120,5 bis 121,5°. $d_4^{13,8}$ = 1,0974. n_α = 1,53073. n_D = 1,53559. n_β = 1,54827 bei 13,8°.

2. $Sp._{34}$ = 146 bis 148°. $d_4^{23,2}$ = 1,1004. n_α = 1,52849. n_D = 1,53331. n_β = 1,54605 bei 23,2°.

	M_α	M_D	$M_\beta - M_\alpha$
Berechnet für $C_9H_{10}O'O''{\models}_3$ (150,8)	41,41	41,70	0,93
Gefunden { 1	42,29	42,62	1,16
Gefunden { 2	42,03	42,35	1,16
EM (Mittel)	+ 0,75	+ 0,79	+ 0,23
EΣ „	+ 0,50	+ 0,58	+ 25 Proz.

Nach den optischen Daten bestanden beide Präparate überwiegend aus *α-Ketol.*

Brombenzyl-methyl-keton wurde in wässerig-alkoholischer Lösung 5 Tage mit Silberoxyd geschüttelt. Das Reaktionsprodukt siedete nach mehrfacher Rektifikation unter 15 mm Druck bei 125 bis 127° und enthielt nur noch Spuren von Halogen.

0,1093 g Substanz: 0,2852 g CO_2, 0,0696 g H_2O.
$C_9H_{10}O_2$: Ber. C 72,0, H 6,7; gef. C 71,2, H 7,1.

$d_4^{16,6}$ = 1,1046. d_4^{20} = 1,101. n_α = 1,51228. n_D = 1,51678. n_β = 1,52875 bei 16,6°. n_D^{20} = 1,5152.

	M_α	M_D	$M_\beta - M_\alpha$
Berechnet für $C_9H_{10}O'O^{<}{\models}_3$ (150,08)	40,86	41,13	0,88
Gefunden	40,79	41,09	1,10
EM	—0,07	—0,04	+ 0,22

Das spektrochemische Verhalten des Körpers und seine Indifferenz gegen Semicarbazid sprechen dafür, daß er kein Oxyketon, sondern ein *Halbacetal* war.

Zur Frage der Konstitution des biochemisch gebildeten Oxy-oxo-propyl-benzols.

Von

C. Neuberg.

Setzt man Benzaldehyd oder Substitutionsprodukte desselben zu einer gärenden Lösung von Zucker bzw. Brenztraubensäure, so entsteht unter der Einwirkung des Hefeferments Carboligase nach den Beobachtungen von *Neuberg* und *Hirsch* sowie von *Neuberg* und *Liebermann* ein *optisch-aktiver Ketonalkohol*[1]). Im Falle des Benzaldehyds ist die betreffende Verbindung ein acyloinartiges Gebilde, das aus je einem Molekül Acetaldehyd und Bittermandelöl zusammengefügt ist. Nach den Eigenschaften der Substanz mußte ihr die Formel

I. $C_6H_5 . CO . \overset{*}{C}HOH . CH_3$ (Benzoyl-methyl-carbinol) oder

II. $C_6H_5 . \overset{*}{C}HOH . CO . CH_3$ (Acetyl-phenyl-carbinol) zukommen.

Zur Entscheidung zwischen beiden Möglichkeiten haben *Neuberg* und *Ohle*[2]) das Erzeugnis der Biosynthese durch Behandlung mit Phenyl-magnesium-bromid in ein noch *optisch-aktives Glykol übergeführt.* Dieses muß den Bau

III. $(C_6H_5)_2 : C(OH)-CH(OH)-CH_3$ (α-Methyl-β, β_1-di-phenyl-äthylen-glykol), oder

IV. $C_6H_5-CHOH-C(OH)(CH_3)(C_6H_5)$ (α, β-Di-phenyl-propylenglykol)

besitzen.

Auf bekanntem Wege, durch Erwärmen mit verdünnter Schwefelsäure, lassen sich solche Glykole unter Wasserabspaltung in entsprechende Ketone verwandeln, denen die Formeln

V. $(C_6H_5)_2 : CH-CO-CH_3$ (Di-phenyl-aceton), bzw.

VI. $C_6H_5-CO-CH(CH_3)(C_6H_5)$ Methyl-phenyl-aceto-phenon)

zuzuerteilen sind.

Aus dem biochemisch gewonnenen Ketol entstand so über das noch optisch-aktive Glykol das Methyl-phenyl-aceto-phenon. Daraus war herzuleiten, daß dem zugehörigen Ausgangsprodukte die Formel II

---

[1]) *C. Neuberg* und *J. Hirsch*, diese Zeitschr. **115**, 282, 1921; *C. Neuberg* und *L. Liebermann*, ebendaselbst **121**, 311, 1921.

[2]) *C. Neuberg* und *H. Ohle*, ebendaselbst **127**, 327, 1922.

des Phenyl-acetyl-carbinols eigen ist; daneben haben *Neuberg* und *Ohle*[1]) auch die Tautomerie mit der Halbacetalform

$$\text{VII.}\quad C_6H_5.\overset{*}{C}H.\overset{*}{C}(OH).CH_3 \quad (\text{CH und C über O verbunden})$$

in Betracht gezogen. Jener Schluß erscheint bündig, solange nicht nachgewiesen wird, daß entgegen den bisherigen Erfahrungen bei der Reaktion des Acyloins mit Phenyl-magnesium-bromid oder bei der nachfolgenden Anhydrisierung zum Keton eine Umlagerung eintritt.

Unabhängig davon ist die durch *v. Auwers* und *Jordan*[2]) aufgeworfene Frage nach der Beständigkeit des Methyl-benzoyl-carbinols, von ihnen als α-Ketol bezeichnet. Zu Vergleichszwecken hatten *Neuberg* und *Ohle* diese Verbindung nach der früheren Vorschrift von *v. Auwers* synthetisch hergestellt und des Autors Angaben über die Eigenschaften der Substanz durchaus bestätigen können; sie fanden jedoch eine geringfügige Änderung des Brechungsexponenten beim Aufbewahren des Körpers. n_{20}^{D} sank von 1,5368 auf 1,5338. Dieser Wert liegt zwischen den Daten für das Methyl-benzoyl-carbinol und das isomere Phenyl-acetyl-carbinol. Daraus war gefolgert, daß die erstgenannte Substanz sich teilweise in die zweite umlagere. Da das stark lävogyre Produkt der Biosynthese durch n/10 NaOH schon in wenigen Stunden sein Drehungsvermögen einbüßt, war angenommen, daß sich hier die Racemisierung über die Stufe des Di-enols, $C_6H_5.C(OH):C(OH).CH_3$, des Dioxy-propenyl-benzols, vollzieht. Dieses Di-enol könnte dann bei der Ketonisierung die beiden isomeren Ketonalkohole der Struktur I und II liefern, ähnlich wie Glucose und Fructose unter dem Einfluß von Hydroxyl-ionen ineinander übergehen; *v. Auwers* und *Jordan* halten eine solche Umlagerung aber für auffallend. Bei einem aus Brom-propiophenon, $C_6H_5.CO.CHBr.CH_3$, synthetisch bereiteten inaktiven Benzoyl-methyl-carbinol fanden sie nur einmal eine Abnahme des Brechungsindex. Bei Einwirkung von Lauge änderte sich der Brechungsindex ihres reinsten Produktes kaum, soweit der unverändert gebliebene und frisch rektifizierte Anteil desselben geprüft wurde. Etwas Substanz war jedoch durch Alkali (unter Abgabe von Benzoesäure, deren Bildung auch *Neuberg* und *Hirsch* beim Isomeren beobachtet hatten) zersetzt; somit wäre jene Verminderung des Brechungsvermögens unter Umständen auf eine derartige Spaltung zu beziehen.

Bei der Darstellung von Ketol aus dem α,β-Phenyl-methyl-äthylenglykol, $C_6H_5.CHOH.CHOH.CH_3$, erkannten *v. Auwers* und *Jordan*, daß das früher[3]) als Benzoyl-methyl-carbinol angesprochene Reaktions-

[1]) *C. Neuberg* und *H. Ohle*, diese Zeitschr. **127**, 331; **128**, 611, 1922.
[2]) *K. v. Auwers* und *O. Jordan*, ebendaselbst **144**, 31, 1923.
[3]) *K. v. Auwers*, B. **50**, 1181, 1917.

produkt in Wirklichkeit aus einem *Gemisch beider isomeren Ketonalkohole* besteht. Beim Versuch, aus dem Brom-benzyl-methyl-keton, $C_6H_5 . CHBr . CO . CH_3$, das Acetyl-phenyl-carbinol, $C_6H_5 . CHOH . CO . CH_3$, zu bereiten, gewannen die Autoren statt dessen, in Übereinstimmung mit *Neuberg* und *Ohle, zugleich das isomere* Benzoyl-methyl-carbinol bzw. sein Acetat. Offensichtlich hat also hier ein Platzwechsel stattgefunden. Die Autoren selbst vergleichen den Vorgang mit der Entstehung von Acetol, $CH_3 . CO . CH_2OH$, aus α-Brom-propion-aldehyd, $CH_3 . CHBr . CHO$, sowie mit dem Übergange vom Acetat des Milchsäure-aldehyds, $CH_3 . CH(OH) . CHO$, in Acetol. Der von ihnen versuchte Austausch des Halogens gegen Hydroxyl im Brom- sowie Jod-benzyl-methyl-keton vollzog sich nicht in normaler Weise. *v. Auwers* und *Jordan* geben dann auch selber an, daß ihr β-Ketol, d. h. unser Acetyl-phenyl-carbinol, Neigung zur Umlagerung aufweist, wie es *Neuberg* und *Ohle* schon bemerkt hatten. Somit bleibt als einziger wirklicher Differenzpunkt die von uns konstatierte Brechungsänderung auch beim α-Ketol. Die Autoren halten die Frage für prüfenswert, ob im biochemischen Arbeitsraume Keime[1]) vorhanden sind, welche die Umlagerung solcher labilen Verbindungen auslösen, wie sie es in der Indazolreihe beobachten konnten. Sobald auf biologischem Wege frisch gewonnenes Ketol zur Verfügung steht, will Herr *v. Auwers* die Güte haben, es spektrochemisch zu untersuchen.

Die Möglichkeit, daß im biochemischen Erzeugnis zunächst das Acetyl-phenyl-carbinol vorliegt, das dann in das Benzoyl-methyl-carbinol übergeht, bietet insofern der Erklärung gewisse Schwierigkeiten, als das physiologische Produkt ja ein starkes Drehungsvermögen aufweist. Einleuchtend erscheint zunächst die dargelegte Beweisführung hinsichtlich des Baues der carboligatischen Substanz. Hinzukommt, daß auch das aus ihr gewonnene und noch optisch-aktive l-α, β-Di-phenyl-propylen-glykol, $C_6H_5 . CH(OH) . C(OH)(CH_3)(C_6H_5)$, ein Derivat des Phenyl-acetyl-carbinols ist und sich als identisch mit der von *McKenzie* und *Wren*[2]) aus l-Benzoin und Methyl-magnesium-jodid synthetisierten Verbindung herausstellte, die wohl sicher die Struktur IV besitzt. Da aber über die Halbacetalform (VII) immerhin eine Verschiebung ohne Aufhebung der optischen Aktivität zu konstruieren wäre, so ist die Möglichkeit nicht von der Hand zu weisen, daß sich die β-Verbindung zum Teil in die α-Form umlagert, oder daß von vornherein die beiden *sehr ähnlichen Isomeren* vorhanden sind.

Für die Feststellung und das Verständnis der Carboligasewirkung[3]), d. h. der acyloinmäßigen Verknüpfung zweier Aldehyde durch ein Ferment, ist die Konfiguration des entstandenen Ketols an sich ohne Belang.

[1]) Im physikalischen Sinne.

[2]) *A. McKenzie* und *H. Wren*, Journ. Chem. Soc. **97**, 473, 1910.

[3]) Vgl. *C. Neuberg* und *E. Reinfurth*, diese Zeitschr. **143**, 553, 1923.

Studien über die physikalisch-chemischen Grundlagen der vitalen Permeabilität.

IV. Mitteilung.

Die Kapillaraktivität des Sauerstoffs und der Kohlensäure an der Grenzfläche Petroläther—Wasser.

Von

R. Brinkman und **A. v. Szent-Györgyi.**

(Aus dem physiologischen Laboratorium der Universität zu Groningen).

(Eingegangen am 26. Oktober 1923.)

Man wird wohl kaum daran zweifeln können, daß in der Biologie der Phasengrenze flüssig—flüssig eine weit hervorragendere Rolle zukommt als der Phasengrenze flüssig—gasförmig, der, abgesehen von einigen Spezialfällen, kaum eine direkte biologische Bedeutung zugeschrieben werden kann. Immerhin aber wird die Oberflächenaktivität einer Substanz gewöhnlich mit ihrem Verhalten an letztgenannter Oberfläche charakterisiert, und wir finden in der biochemischen Literatur kaum einige Angaben über Messungen an der erstgenannten Grenzfläche flüssig—flüssig. Hingegen wird oft zur Erklärung des biologischen Verhaltens einer Substanz ihr Einfluß auf die Oberfläche flüssig—gasförmig herangezogen, wobei stillschweigend die Annahme gemacht wird, daß die Substanz sich auch an der biologisch mehr in Betracht kommenden Grenzfläche flüssig—flüssig in analoger Weise beträgt als an der Oberfläche flüssig—gasförmig.

Diese Anschauung wird wohl in den meisten Fällen annähernd zutreffen und die Substanzen, die an der Wasser—Luftoberfläche eine höhere Kapillaraktivität besitzen, haben auch gewöhnlich eine stärker erniedrigende Wirkung auf die Spannung der Flüssig—Flüssig-Grenzfläche. Dies ist der Fall z. B. bei einer Reihe biologisch wirksamer Alkaloide, die, so wie wir finden, die Spannung an der Grenzfläche Petroläther—Wasser nicht oder nur wenig stärker erniedrigen als an der Wasser—Luftoberfläche (Atropin, Pilocarpin, Strychnin, Coffein, Morphin, Codein, Novocain).

Immerhin scheint es aber Substanzen zu geben, die die Spannung an den beiden genannten Grenzflächen nicht in derselben Weise beeinflussen, sondern auf die eine oder andere mehr oder minder spezifisch einwirken. So fand *Bubanovic*[1]) ein kapillaraktives Verhalten bei Normal-Buttersäure und Chloralhydrat an der Grenzfläche Wasser—Olivenöl, während an dieser Phasengrenze viele andere organische Stoffe, wie Äthylalkohol, Chloroform, Benzol, Xylol, Terpentinöl, welche an der Oberfläche Wasser—Luft ausgesprochen kapillaraktiv sind, die Grenzflächenspannung so gut wie unbeeinflußt ließen.

Weiter sind auch nach *Reinders*[2]) an der Wasser—Ölgrenzfläche die Seifen merkbar stärker grenzflächenaktiv als die zugehörigen Fettsäuren, weil diese letzten stark in Öl löslich sind. Auch die Salze, welche die Oberflächenspannung Wasser—Luft meist ein wenig erhöhen, haben an der Flüssig—Flüssig-Grenzfläche vielfach eine leicht erniedrigende Wirkung. Doch sind diese Spannungserniedrigungen durch Salze nicht erheblich, zumal nicht, wenn diese in biologischen Konzentrationen vorkommen.

Aus diesem Beispiel geht es zur Genüge hervor, daß man aus dem Verhalten einer Substanz an der Oberfläche flüssig—gasförmig ohne weiteres keine Schlüsse auf ihr Verhalten an der Grenzfläche flüssig—flüssig ziehen kann, und aus diesem Grunde schien es uns für die Analyse der vitalen Permeabilität wünschenswert, das Verhalten einiger biologisch wichtiger Substanzen vergleichend an beiden Oberflächen zu untersuchen, und zwar haben wir zunächst die drei Gase einer Untersuchung unterzogen, die in der Biologie durch ihr besonderes Permeierungsvermögen eine Sonderstellung einnehmen, namentlich den Sauerstoff, die Kohlensäure und das Ammoniak. Wir wollen vorausgreifend schon hier das Ergebnis dieser Messungen zusammenfassen: alle drei Substanzen, von denen der Sauerstoff und das Ammoniak die Spannung an der Oberfläche Wasser—Luft praktisch unbeeinflußt lassen, zeigen an der Oberfläche Wasser—Petroläther eine typische Kapillaraktivität[3]).

Methodik.

Mit der Torsionswage[4]) gestaltet sich die Bestimmung der Grenzflächenspannung zwischen zwei nicht mischbaren Flüssigkeiten sehr einfach. Wir haben in erster Linie die Spannung zwischen reinem Wasser und Petroläther (Siedepunkt 40 bis 60°) untersucht, weil der

[1]) *Bubanovic*, K. Vetensk. Nobelinstitut 2, Nr. 17, 1911.

[2]) *Reinders*, v. Bemmelen-Festschrift 1910, S. 333.

[3]) Ebenso zeigten einige vitale Farbstoffe die genannte Spezifität der Wirkung auf der Oberfläche flüssig—flüssig (Wasser—Petroläther).

[4]) *Brinkman* und *van Dam*, Münch. med. Wochenschr. 1921, S. 1550.

Äther durch mehrmaliges vorsichtiges Umdestillieren frei von Verunreinigungen zu bekommen ist, was mit Öl äußerst schwierig geht. Der Äther war in jedem Versuch frisch destilliert. Wenn der Platinring der für die Bestimmung der Oberflächenspannung dient, rein ausgeglüht und mit kapillar-chemisch reinem Wasser (Leitungswasser) benetzt ist, so haftet er immer leichter an Wasser als an Petroläther, und man kann die Bestimmung der Grenzflächenspannung in einem kleinen Becherglase an der mit einer hohen Petrolätherschicht bedeckten Wasseroberfläche in derselben Weise und ebenso leicht ausführen als an der Wasser—Luftoberfläche.

Für reines Wasser bei 15° (Oberflächenspannung 73 dyn) war bei dem verwendeten Ringe eine Kraft von 136 mg notwendig, um die Oberfläche zu zerreißen, für den verwendeten Petroläther eine Kraft von 44 mg. Die Oberflächenspannung des Petroläthers war also 23 dyn[1]).

Gießt man nun den frisch destillierten trockenen Petroläther vorsichtig in einem kleinen Becherglase auf reines Wasser, so ist die Grenzflächenspannung sofort konstant 38,5 dyn. Eine allmähliche Erniedrigung durch Lösung der beiden Flüssigkeiten ineinander ist hier nicht zu beobachten, vielleicht wegen der geringen Löslichkeit dieses Kohlenwasserstoffes in Wasser.

Löst man nun verschiedene Substanzen in Wasser und (oder) in Petroläther, so kann man leicht ihren Einfluß auf den beiden Oberflächenspannungen und auf die Grenzflächenspannung messen. Wie gesagt, findet man dann, daß die meisten der sogenannten stark kapillaraktiven Substanzen an der Wasser—Äthergrenzfläche analoge Aktivität zeigen wie an der Wasser—Luftoberfläche.

Die Salze geben meistens eine leichte Erniedrigung[2]), welche in biologischen Konzentrationen nicht groß sein kann. Das zeigt folgende Tabelle.

Grenzflächenspannung	dest. Wasser—dest. Petroläther	38,5 dyn
„	m NaCl—dest. Petroläther	37,6 „
„	m KCl—dest. Petroläther	37,5 „
„	m $CaCl_2$—dest. Petroläther	37,6 „
„	m $NaHCO_3$—dest. Petroläther	37,5 „

Wie erwähnt, wird aber bei dem Sauerstoff eine spezifische Kapillaraktivität gefunden. Sättigung des Wassers in der Kälte und des Petroläthers bei atmosphärischem Druck mit Sauerstoff gibt keine erhebliche Änderung der Oberflächenspannungen dieser Flüssigkeiten, aber eine

[1]) *T. Tominaga*, diese Zeitschr. **140**, 230, 1923.
[2]) Siehe *W. C. McLewis*, Phil. Mag. **17**, 466, 1909; *Loránt*, Pflügers Arch. **157**, 211, 1914.

sehr deutliche Erniedrigung der Grenzflächenspannung, wie es in folgender Tabelle gezeigt wird.

Oberflächenspannung	des ausgekochten Wassers bei 15° . .	73,5 dyn
„	mit O_2-gesättigtem Wasser bei 15° . .	73 „
„	„ frisch dest. Petroläther bei 15° .	23 „
„	Petroläther mit O_2 gesättigt	23 „
Grenzflächenspannung	$\frac{\text{ausgekochtes Wasser}}{\text{Petroläther}}$	39,5 „
„	$\frac{\text{Wasser}}{\text{Petroläther}}$ mit O_2 gesättigt	32 „

Bei atmosphärischem Sauerstoffdruck bei 15° wird also die Grenzflächenspannung zwischen Wasser und Petroläther um 19 Proz. erniedrigt.

Eine noch etwas stärkere Grenzflächenaktivität kann bei der Kohlensäure gefunden werden. Hier bei CO_2 liegt die Sache aber anders. Beim Durchleiten von gasförmigem CO_2 durch Wasser und Petroläther ist kein Einfluß auf die Grenzflächenspannung zu konstatieren. Sehr gut gelingt es aber, eine Kapillaraktivität nachzuweisen, wenn man Petroläther über eine verdünnte $NaHCO_3$-Lösung schichtet und dann vorsichtig reine $\pm$ n/10 Salpetersäurelösung zu der wässerigen Lösung fügt[1]). Die beobachtete Erniedrigung beträgt von 38,5 auf ungefähr 30 dyn.

Es ist nun aber wichtig, daß man beim Neutralisieren einer $NaHCO_3$-Lösung durch HNO_3 auch an der Wasser—Luftoberfläche eine deutliche Spannungserniedrigung beobachtet im Moment da die Lösung leicht sauer wird. Diese Erniedrigung beträgt ungefähr 5 dyn und verschwindet, wenn die Lösung geschüttelt wird und einige Zeit steht, oder sofort, wenn eine stärkere Entwicklung von CO_2-Blasen eintritt. Offenbar ist die Ursache dieser Erscheinung die Bildung der instabilen, ziemlich starken Säure H_2CO_3, welche sich bald in $H_2O + CO_2$ spaltet, wie es von *Thiel* und von *Michaelis* beschrieben wurde[2]). Daß die H_2CO_3 im undissoziierten Zustande eine Kapillaraktivität zeigt, könnte man ja wohl erwarten. Es erscheint uns von Interesse, auch beim Vorkommen von Kohlensäure im Blute usw., wo es doch meistens aus Bicarbonat entstanden ist, an die Kapillaraktivität der instabilen H_2CO_3-Formen zu denken.

Auch das undissoziierte NH_4OH hat einen erheblichen Einfluß auf die Grenzflächenspannung zwischen Petroläther und Wasser,

---

[1]) Selbstverständlich muß man erst prüfen, ob die Lösungen an sich nicht kapillaraktiv sind; kapillar-chemisch reines HNO_3 bereitet man am besten durch Verdünnung von rauchender Salpetersäure, weil hierin alle Verunreinigungen oxydiert sind.

[2]) Siehe bei *Michaelis*, Die Wasserstoffionenkonzentration, S. 13.

obwohl es an der Wasseroberfläche so gut wie inaktiv ist. Das geht aus folgenden Daten hervor.

		Spannung
Reines Wasser		73 dyn
	+ 0,2 Proz. Ammoniak	73,2 „
Reines Wasser	+ Petroläther	38 „
	+ 0,2 Proz. Ammoniak	34 „
	+ 5 Proz. NH_4Cl	24 „
Reines Wasser		73 „
	+ 5 Proz. NH_4Cl	74 „
5 Proz. NH_4Cl	+ Petroläther	37 „
	+ 0,2proz. NH_3	24 „

Die Grenzflächenaktivität des Ammoniaks könnte sowohl durch die alkalische Reaktion als durch die spezifische Wirkung des undissoziierten NH_4OH erklärt werden. Die Wasser—Petrolätherspannung wird nämlich durch alkalische Reaktion erheblich erniedrigt, wie wir in einer späteren Mitteilung berichten werden[1]); durch Neutralisation nimmt sie wieder den Maximalwert an. Daß aber in diesem Falle die Herabsetzung der Grenzflächenspannung durch undissoziierten Ammoniak verursacht wird, geht aus dem Effekt der Dissoziationszurückdrängung durch NH_4Cl hervor, das in einer Ammoniaklösung eine bedeutende Erniedrigung der Grenzflächenspannung bedingt, obwohl das NH_4Cl an sich nicht aktiv ist.

Die oben wiedergegebenen Tatsachen scheinen uns für die selektive Permeabilität der Zellmembran für Sauerstoff, Kohlensäure und Ammoniak eine grundlegende Bedeutung zu haben. Man hat vielfach die Lipoidlöslichkeit dieser Substanzen, welche meistens mit der Grenzflächenaktivität parallel geht, als Ursache ihres spezifischen Permeierungsvermögens angesehen; wir glauben aber, daß auch die Grenzflächenaktivität ein für die Permeabilität sehr wichtiger Faktor ist, wie es aus unseren früheren Mitteilungen hervorgeht. Dabei ist bedeutungsvoll, daß eine grenzflächenaktive Substanz nicht nur eine Permeabilität für sich selbst, *sondern auch für andere Substanzen bedingen kann.*

Es wurde in dieser Untersuchung also gezeigt, daß Sauerstoff, Kohlensäure und Ammoniak an einer bestimmten Grenzfläche flüssig—flüssig, nämlich an der Grenze Petroläther—Wasser eine spezifische spannungserniedrigende Wirkung aufweisen. Inwieweit diese Verhältnisse auf biologische Phasengrenzen Lipoid—Wasser übertragen werden können, mag noch untersucht werden.

[1]) Siehe auch *R. Brinkman* u. *A. v. Szent-Györgyi*, Contraction of a drop of water by change of reaction. Proc. Physiol. Soc. July 7, 1923. Il Physiol. Vol. 57.

Über den Vitamingehalt des Brotes.

Von

Saburo Hara aus Tokio.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Würzburg.)

(Eingegangen am 26. Oktober 1923.)

Mit 5 Abbildungen im Text.

Schon 1870 fand *Magendie*[1]), daß Tauben und Hunde bei Fütterung mit reinem Weizenmehl zugrunde gehen, dagegen bei Fütterung mit Roggen am Leben bleiben. Diese Beobachtung wurde von *Oseki*[2]) bestätigt. Während mit Roggenbrot gefütterte Mäuse gesund blieben, hatten die Tiere, welche Weizenbrot bekamen, nur eine mittlere Lebensdauer von 23 Tagen. Die für die Erhaltung des Lebens notwendigen Bestandteile des Roggenbrotes ließen sich mit Wasser ausziehen.

Außer der Frage, welche Arten von Cerealien bzw. in welchem Verhältnis diese zur Brotbereitung am zweckmäßigsten zu verwenden seien, ist auch stets die des Ausmahlverfahrens viel erörtert worden. Zugunsten des feingemahlenen Mehles wird (außer der wenigstens für viele größeren Schmackhaftigkeit des Weißbrotes) vor allem auf dessen leichtere Konservierbarkeit hingewiesen. Dann soll die Resorbierbarkeit des Weißbrotes eine bessere sein als die eines viel Kleie enthaltenden, das unter Umständen sogar die normale Ausnutzung anderer, gleichzeitig genommener Nahrungsstoffe hindern soll. Nach *Berczeller*[3]) wird der Nährwert der Cerealien (Weizen und Roggen) durch das Ausmahlen wesentlich verändert. Jedenfalls können durch das neuzeitliche Mahlverfahren wichtige Nährstoffe entfernt werden[4]). Dies mag in normalen Zeiten, in denen außer Brot genügend andere Nahrungsmittel der Bevölkerung zur Verfügung stehen, keinen besonderen Schaden verursachen, wird aber unter Umständen von Bedeutung, wenn bei schwieriger Ernährungslage das Brot einen großen Prozentsatz in der Gesamternährung darstellt.

---

[1]) *Magendie*, zit. nach *Gust. Meyer*, Zeitschr. f. Biol. **7**, 1, 1871.
[2]) *S. Oseki*, diese Zeitschr. **65**. 158, 1914.
[3]) *L. Berczeller*, ebendaselbst **129**, 289, 1922.
[4]) *C. Funk*, Die Vitamine, 2. Aufl. München und Wiesbaden 1922.

Daher besitzen Untersuchungen und Erörterungen darüber, wie der Nährwert des Getreides am besten auszunutzen ist, nicht nur wissenschaftliches Interesse, sondern auch größte praktische Bedeutung.

Seitens der Ernährungsphysiologie wurde in den letzten Jahren immer größere Beachtung dem Mineralstoffwechsel und dem neuen Gebiet der Vitamine zugewendet. Beide Fragen sind in der sonst naturgemäß großen Literatur über das Brot merkwürdigerweise noch recht spärlich behandelt[1]).

Es fehlen noch systematische Untersuchungen darüber, wie das Ausmahlen, der Teig- und Backprozeß, sowie das „Säuern" auf den Vitamingehalt der Cerealien einwirken. Bei Verwendung von Hefe zur Teigbereitung kann ein Teil des B-Vitamins im fertigen Brote natürlich auch aus dieser Quelle stammen.

Im Laufe von Untersuchungen über den Vitamingehalt von Speisepilzen[2]) machte ich auch verschiedene Beobachtungen über den Nährwert des sogenannten „*Markenbrotes*", die von gewissem Interesse sind wegen der noch wenig geklärten Frage des Vitamingehaltes von Brot überhaupt, vor allem aber wegen der weit verbreiteten Anwendung dieser Brotsorte in Deutschland in der Kriegs- und Nachkriegszeit. Bei der in Deutschland während des Krieges notwendig gewordenen Rationierung der wichtigeren Lebensmittel konnte man auch Brot nur gegen Abgabe der jedem Haushalt nach Kopfzahl zugewiesenen Marken — daher der Name — erhalten. Nach dem Kriege mußte dieses Markenbrot beibehalten werden. Die Zusammensetzung des Markenbrotes war je nach der allgemeinen Ernährungslage Deutschlands wie auch der besonderen Verhältnisse der einzelnen Städte eine wechselnde. Weizen wurde meist wenig dazu verwendet, mehr Gerste und vor allem Roggen. Dessen Ausmahlung schwankte in erheblichen Grenzen und erreichte zeitweise bis zu 95 Proz.[3]). Außerdem wurde das Mehl vielfach durch Zufuhr von Kartoffel-, Bohnenstärke usw. „gestreckt".

Das von mir verwendete Brot war das in Würzburg im Winter 1922/23 erhältliche Markenbrot. Es zeigte, wie wiederholte Untersuchungen, bei denen mich liebenswürdigerweise Herr Regierungschemiker Dr. *Amberger* unterstützte, ergaben, eine recht konstante Zusammensetzung.

Die mit Thionin gefärbten Ausstriche zeigten, daß das Brot in der Hauptsache Roggenmehl enthielt, das nur mit wenigen Prozenten

---

[1]) *R. O. Neumann*, Das Brot. Berlin 1922.

[2]) *S. Hara*, Über den Vitamingehalt der Speisepilze. Diese Zeitschr. **142**, 79, 1923.

[3]) *Noorden* und *Salomon*, Allgemeine Diätetik. I. Band des Handbuches der Ernährungslehre, S. 400. Berlin 1920.

Gersten- und Weizenmehl vermischt war. Kleienbestandteile waren reichlich vorhanden; andere Beimengungen wurden nicht festgestellt. Das Fehlen von Kartoffelstärke wurde außerdem noch durch das Diastaseverfahren von *Amberger*[1]) (verschiedene Widerstandsfähigkeit der einzelnen Stärkearten gegen Diastase) nachgewiesen. Es lag also ein hochausgemahlenes Roggenbrot mit geringen Zusätzen von Weizen- und Gerstenmehl vor.

Versuchsanordnung.

Ich benutzte Ratten von 130 bis 160 g Gewicht. Alle meine Versuchstiere waren relativ alt, aber immerhin noch in der Wachstumsperiode. Es waren Bastarde von weißen Ratten und grauen Hausratten. Die Haltung und Fütterung der Tiere entsprach der schon früher beschriebenen Versuchsanordnung[2]). Bei den Versuchen verwendete ich absolut vitaminfreies Futter. Es wurde den Tieren folgendes Futter gereicht: Ausgekochtes Fleisch, Reis, Fett und Nährsalze. Das Fleisch war genügend gekochtes Pferdefleisch, ausnahmsweise ist auch Rindfleisch verwendet worden. Die verwendete Futtermischung hatte folgende Zusammensetzung: 50 g polierter Reis (gekocht), 23 g ausgekochtes Pferdefleisch, 4 g Salzmischung, 13 g geschmolzenes Cocosfett, hinzu kam noch eine entsprechende Wassermenge. Diese Mischung bezeichne ich als „Grundfutter" meiner Versuche.

Zwecks Kontrolle wurden von bekannten vitaminhaltigen Materialien Hefeextrakte, Malzkeimextrakt, Rübenextrakt, Tomatenextrakt, Zwiebeln, Kartoffeln und anderes mehr verwendet.

Die *erste Gruppe* der Tiere bekam Grundfutter und Lebertran, welch letzterer sich durch einen hohen Gehalt an A-Vitamin auszeichnet. Dieses Futter ist frei von B- und C-Vitamin.

Die *zweite Gruppe* der Tiere bekam das Grundfutter, außerdem täglich 5 g Schwarzbrot an Stelle von Reis.

Die Tiere beider Gruppen wurden monatelang beobachtet und insbesondere alle Gewichtsveränderungen registriert.

Verlauf des Versuches.

Ratten der Gruppe 1. Futter frei von B- und C-Vitamin.

Ich verwendete zu diesem Versuch zehn Ratten. Die Tiere, die das A-Vitamin-haltige Futter erhielten, nahmen dasselbe in den ersten Tagen gern auf. Das Befinden aller Tiere war in den ersten 10 Tagen durchweg sehr gut, sie waren munter und zeigten ein normales Aussehen. Nach einem Monat war die Geschicklichkeit ihrer Bewegungen vermindert; allmählich wurden die Tiere immer ruhiger. Schon gegen Ende der ersten Woche trat bei den meisten ein merklicher Gewichtssturz ein. Die Pflege des Felles wurde zunehmend vernachlässigt. Am Schwanze traten kleine Unebenheiten in Knötchenform auf, ebenso an Ohren und Nase. Parallel mit diesen Erscheinungen ging eine ausgesprochene Lichtscheu. Die Körperpflege wurde immer mehr vernachlässigt, so daß das Fell einen struppigen Charakter annahm. Etwa die Hälfte der Tiere wurde sehr empfindlich gegen Reize, was sich besonders beim Fassen mit der Pinzette äußerte;

---

[1]) *K. Amberger*, Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußmittel **42**, 181, 1921.

[2]) *S. Hara*, l. c. Diese Zeitschr. **142**, 79, 1923.

hierbei waren sie ängstlich und zeigten große Neigung zum Beißen. Am meisten fielen leichte Gehstörungen ins Auge. Die normalen lebhaften Kopfbewegungen fehlten schon in den ersten Wochen. Die Ratten vermochten sich nur schwerfällig schwankend fortzubewegen. Sie glitten auf geneigtem Boden sehr leicht aus. Andere Tiere bewegten sich wieder mit schleichendem, selbst kriechendem Gange vorwärts. Bei der Mehrzahl der Tiere blieb zwar eine gute Beweglichkeit der vorderen Beine erhalten, die hinteren dagegen waren beim Laufen leicht gespreizt, zeigten große Steifheit und machten daher sehr ungeschickte Bewegungen. Setzte man ein derartig erkranktes Tier auf die Tischplatte, so machte es keinen Fluchtversuch mehr, hatte nur eine besondere Vorliebe, in seinen Käfig zurückzukehren. Krämpfe und Rollbewegungen kamen niemals zur Beobachtung.

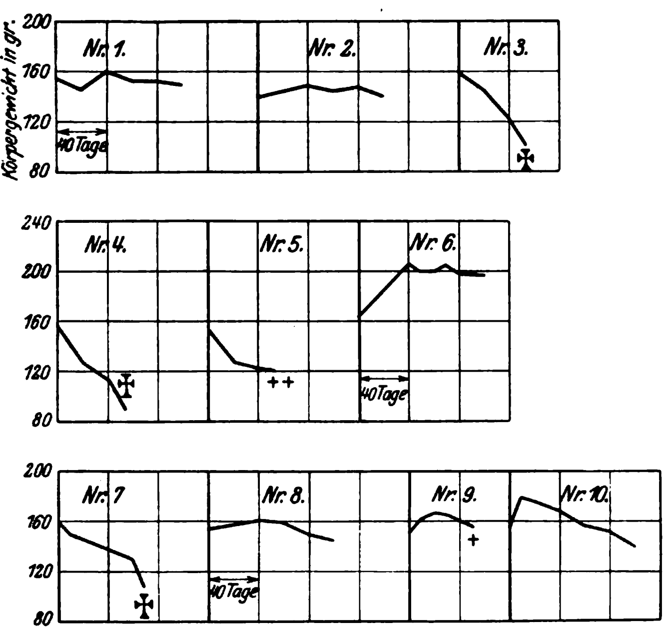


Abb. 1. Gewichtskurven der Ratten Nr. 1 bis 10. Vitaminfreies Grundfutter mit Lebertran. † Tod. + Versuch abgebrochen. ++ Zu einem Heilversuch mit Hefe verwendet.

Im Käfig saßen die Tiere gewöhnlich mit gekrümmtem Rücken, waren sehr ruhig und schliefen, außer bei der Fütterung, den ganzen Tag. An den Augen waren bis zum Versuchsabbruch keine schweren Krankheitssymptome zu beobachten. Obwohl ich mitunter Lichtscheu beobachtete, habe ich nur in einigen Fällen Conjunctivitis gefunden. Bei vielen Tieren waren in den letzten Tagen die Pfoten förmlich zerfleischt. In drei Fällen beobachtete ich lange andauernden Penisprolaps, der sich bei einem Tiere sogar monatelang hinzog.

Meine Versuchstiere waren bedeutend widerstandsfähiger als die sogenannten „weißen Ratten", was aus einem Vergleich meiner Versuche mit denen *Hofmeisters*[1]) hervorgeht.

[1]) *F. Hofmeister*, diese Zeitschr. **128**, 540, 1922.

Tabelle I.

Erste Gruppe. (Grundfutter und Lebertran.)
Gewichtsveränderung der Ratten.

Versuchstage	Ratte Nr. 1	Ratte Nr. 2	Ratte Nr. 3	Ratte Nr. 4	Ratte Nr. 5	Ratte Nr. 6	Ratte Nr. 7	Ratte Nr. 8	Ratte Nr. 9	Ratte Nr. 10
1	155	140	158	157	155	165	160	154	150	156
10	148	144	145	124	132	173	150	162	161	180
20	147	144	146	127	129	186	146	156	167	179
30	153	140	134	125	130	185	136	151	165	175
40	158	148	122	117	122	206	138	161	160	168
50	155	152	122	100	121	200	136	164	157	164
54	—	—	—	90 †		—	—	—	....	—
55	—	—	102 †			—	—	—		—
60	154	146				198	130	158		156
68	—	—				—	108 †	—		—
70	151	146				205		155		158
80	153	148				199		147		152
90	152	145				197		147		147
100	149	140				197		145		141

Zeichen † bedeutet: gestorben.
Zeichen --- bedeutet: Abbrechen des Versuchs.
Gewichtsangabe in Grammen.

Obwohl also diese Tiere gegen vitaminfreie Fütterung relativ widerstandsfähig waren, so ergibt sich doch ein großer Unterschied gegenüber Tieren mit vitaminhaltigem Futter, was besonders an der Gewichtsveränderung zu beobachten ist.

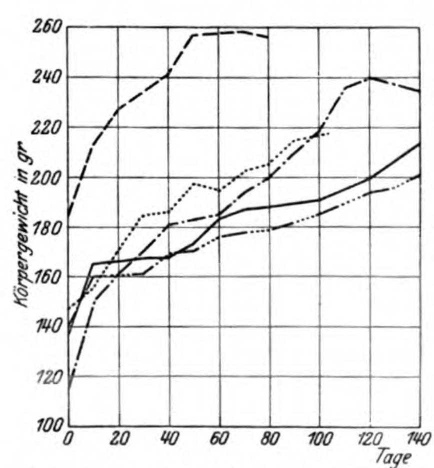


Abb. 2. Gewichtskurven der Ratten Nr. 12, 13, 17, 18 u. 19. Vitaminfreies Grundfutter mit Brotzulage. ——— Nr. 12. ------- Nr. 13. ········· Nr. 17. — — — Nr. 18. -·-·-·- Nr. 19.

Aus Tabelle I ist ersichtlich, daß schließlich sämtliche zehn Ratten an Gewicht abnahmen. Drei Tiere sind zwischen dem 54. und 68. Versuchstage eingegangen. Bei Nr. 3 und 4 kamen *Skorbut*symptome dazu. Nr. 5 wurde zu einem Heilversuch mit Hefe verwendet.

Beim Tier Nr. 9 wurde aus äußeren Gründen der Versuch frühzeitig abgebrochen. Die anderen Ratten wurden über 100 Tage beobachtet (s. auch Abb. 1).

Ratte Nr. 6, das älteste und schwerste Tier, zeigte offenbar wegen geringeren Vitaminbedarfs oder größerer Vitaminreserve, auffallend lange Zeit noch Gewichtszunahme, und erst am Ende des zweiten Monats ähnlich wie die übrigen Tiere Abnahme des Körpergewichts.

Ratten der Gruppe 2.

Die zweite Gruppe bildeten ebenfalls zehn Ratten.

Die Tiere bekamen vitaminfreies Grundfutter und Markenbrot. Die Brotmenge, die an Stelle von Reis gegeben wurde, betrug täglich 5 g. Über die Bestandteile des verwendeten Brotes wurde bereits oben berichtet.

Die Tiere dieser Gruppe zeigten fast normalen Gesundheitszustand; auch war in ihrem Wachstum gegenüber Tieren, die normales Futter erhielten, kaum ein Unterschied festzustellen (vgl. Tabelle II und Abb. 2 und 3).

Tabelle II.

Zweite Gruppe. (Grundfutter und Markenbrot.)
Gewichtsveränderung der Ratten.

Versuchstage	Ratte Nr. 11	Ratte Nr. 12	Ratte Nr. 13	Ratte Nr. 14	Ratte Nr. 15	Ratte Nr. 16	Ratte Nr. 17	Ratte Nr. 18	Ratte Nr. 19	Ratte Nr. 20
1	145	137	115	166	132	123	147	184	139.	127
10	179	165	150	195	160	160	156	213	160	146
20	176	166	161	213	188	180	169	227	168	159
30	184	168	170	218	202	197	185	235	161	175
40	207	168	181	238	217	213	186	241	169	188
50	209	173	183	245	229	225	198	257	170	190
60	215	183	185	238	235	230	195	258	176	200
70	235	187	194	240	230	232	203	258	178	195
80	245	188	200	249	230	233	206	256	179	196
86	—	—	—	—	—	—	—	250	—	—
87	253	182	206	247	243	230	211	......	178	213
	B—	B+	B+	B—	B—	B—	B+		B+	B—
90	253	183	210	245	233	229	215		175	223
100	256	191	218	248	236	224	217		185	206
110	257	201	236	251	206	220	...		199	186
120	255	200	240	238	.....	213			194	
130	248	206	237	237		200			196	
140	245	213	235	234		188			201	

Zeichen B— bedeutet: Brot entzogen.
Zeichen B+ bedeutet: Brot weiter zugegeben.
Zeichen --- bedeutet: Versuch abgebrochen.
Gewichtsangabe in Grammen.

Beim Vergleich der Tabelle I mit Tabelle II findet man die Unterschiede in den Gewichtskurven.

Auch aus Tabelle III ist der Unterschied im Verhalten des Körpergewichts bei beiden Gruppen ersichtlich.

Tabelle III.

Ratten der Gruppe 1. (Grundfutter und Lebertran.)
Veränderung des Gewichts nach 90 Tagen in Grammen.

Ratte Nr. 1	Ratte Nr. 2	Ratte Nr. 3	Ratte Nr. 4	Ratte Nr. 5	Ratte Nr. 6	Ratte Nr. 7	Ratte Nr. 8	Ratte Nr. 9	Ratte Nr. 10
— 3	+ 5	— 56 55. Tag tot	— 67 54. Tag tot	— 34 50. Tag abgebrochen	+ 32	— 52 68. Tag tot	— 7	+ 7 50. Tag abgebrochen	— 9

Tabelle III. (Fortsetzung.)

Ratten der Gruppe 2. (Grundfutter und Brot.)

Zunahme des Gewichts nach 87 Tagen in Grammen.

Ratte Nr. 11	Ratte Nr. 12	Ratte Nr. 13	Ratte Nr. 14	Ratte Nr. 15	Ratte Nr. 16	Ratte Nr. 17	Ratte Nr. 18	Ratte Nr. 19	Ratte Nr 20
+ 108	+ 45	+ 91	+ 81	+ 111	+ 107	+ 64	+ 66	+ 39	+ 86

Zeichen — bedeutet: Gewichtsabnahme.
Zeichen + bedeutet: Gewichtszunahme.

Wie aus obiger Tabelle ersichtlich, haben alle Ratten der Gruppe 2 zugenommen, und zwar zwischen 39 und 111 g. Die Freßlust sowie das Allgemeinbefinden waren während dieser Zeit sehr gut. Außer etwas mattem Glanz des Felles zeigte sich keinerlei Veränderung.

Gruppe 3. (Vitaminfreies Grundfutter ohne irgend einen Zusatz.)

Nach etwa 3 Monaten, am 87. Versuchstage, wurde einem Teil der Tiere, nämlich den Ratten Nr. 11, 14, 15, 16 und 20 das Brot entzogen. Diese Tiere wurden weitere 50 Tage beobachtet. Sie bildeten die Gruppe 3.

Dagegen wurde den Ratten Nr. 12, 13, 17 und 19 der Gruppe 2 das Brot nicht entzogen.

Die erstgenannten Tiere, denen das Brot entzogen wurde (Abb. 3), zeigten in den ersten 15 bis 25 Tagen unter Umständen noch geringe Gewichtszunahme, nahmen aber dann ziemlich rasch an Gewicht ab. So ging Ratte Nr. 15 im Gewicht nach 23 Tagen von 243 auf 206 g zurück, Nr. 20 in der gleichen Zeit von 213 auf 186 g. Dieses Tier wurde zu einem Heilversuch mit Steinpilzen verwendet. Zeichen von Rachitis wurden nicht beobachtet. Das allgemeine Befinden verschlechterte sich entsprechend dem Gewichtssturz; die Tiere verhielten sich also wie die der Gruppe 1. Beide standen ja auch unter fast gleichen Ernährungsverhältnissen; nur erhielten die Ratten der Gruppe 1 Lebertran, während die der Gruppe 3 keinen Lebertran erhielten. Dadurch mag sich vielleicht der meist etwas geringe Gewichtssturz bzw. die manchmal in den ersten Wochen vorhandene Gewichtszunahme bei den Tieren der Gruppe 1 erklären.

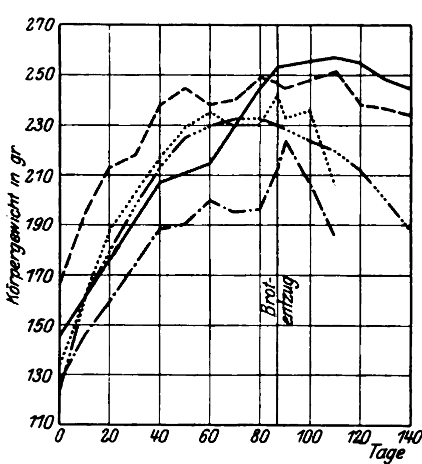


Abb. 3. Gewichtskurven der Ratten Nr. 11, 14, 15, 16 und 20. 1. bis 86. Tag vitaminfreies Grundfutter mit Brotzulage. Ab 87. Tag nur „Grundfutter". ——— Nr. 11. — — — Nr. 14. ········ Nr. 15. -·-·-·- Nr. 16. --------- Nr. 20.

Die Kontrolltiere (12, 13, 17, 19), denen das Brot nicht entzogen worden war, nahmen dagegen weiter an Gewicht zu und zeigten im Laufe von zwei weiteren Monaten keinerlei Krankheitserscheinungen (Abb. 2).

Das Auftreten neuritischer Erscheinungen und die Gewichtsabnahme bei den Ratten, die ohne Brot gefüttert wurden (Gruppe 1) bzw. denen nach einiger Zeit die anfängliche Brotzulage wieder entzogen wurde

(Gruppe 3), ist bei der sonst bestimmt B-Vitamin-freien Kost in erster Linie auf das Fehlen dieses Ergänzungsnährstoffes zurückzuführen. Dies wurde auch dadurch nachgewiesen, daß bei Verabreichung sicher B-Vitamin enthaltender Substanzen (Hefe, Steinpilz usw.) die Krankheitssymptome in kurzer Zeit aufgehoben wurden und das Körpergewicht von neuem anzusteigen begann (Abb. 4 und 5).

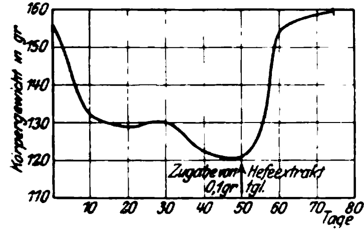


Abb. 4. Gewichtskurve der Ratte Nr. 5. Vitaminfreies Grundfutter mit Lebertran.

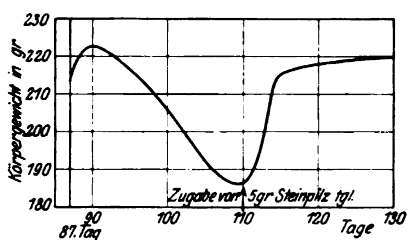


Abb. 5. Gewichtskurve der Ratte Nr. 20. Vitaminfreies Grundfutter.

Aus Vergleichsversuchen mit Hefe, Steinpilz (Boletus edulis) und Brot ergab sich, daß eine Beigabe zum Grundfutter von 2 g Bierhefe, entsprechend 0,1 g Hefeextrakt oder etwa 5 g Steinpilz, in feuchtem Zustande ungefähr den gleichen günstigen Einfluß auf das Wachstum der Ratten ausübte wie 5 g Brot.

Zusammenfassung.

Zur Prüfung des deutschen Markenbrotes, eines stark ausgemahlenen Roggenbrotes mit Zusatz von Gerste und Weizen, auf Vitamine wurden Fütterungsversuche an Ratten angestellt.

1. Noch nicht erwachsene Ratten, die mit einem B- und C-Vitamin-freien Grundfutter, aber mit Zusatz von Lebertran, ernährt wurden, erkrankten nach einiger Zeit unter beriberiähnlichen Erscheinungen und zum Teil starker Gewichtsabnahme (Gruppe 1).

2. Bei Zugabe von Brot zum vitaminfreien Grundfutter nahmen solche Tiere an Gewicht ständig zu und zeigten so gut wie keine Gesundheitsstörungen (Gruppe 2).

3. Ratten der Gruppe 2, denen nach einiger Zeit das Brot wieder entzogen wurde, erkrankten an beriberiähnlichen Erscheinungen und starker Gewichtsabnahme (Gruppe 3).

Daraus ist zu folgern: Im untersuchten Markenbrot sind Vitamine, die das Wachstum befördern und Beriberi verhüten („Nutramine“ und „Eutonine“), vorhanden. Ein Gehalt an antirachitischen Stoffen konnte nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden.

Das physiologische Verhalten der Glucosane.

Von

Johannes Kerb.

Vorläufige Mitteilung.

Zur Kenntnis der Glucosane.

Von

Johannes Kerb und Elisabeth Kerb-Etzdorf.

(Aus dem Krönighaus der Universitäts-Frauenklinik Freiburg i. Br.)

(Eingegangen am 26. Oktober 1923.)

Vor 9 Jahren veröffentlichte *Erich Grafe*[1]) seine Erfahrungen über die Behandlung des Diabetes mit sogenanntem „Karamel"[2]). Von der Anschauung ausgehend, daß der diabetische Organismus nicht ein allgemein herabgesetztes Oxydationsvermögen besitzt, sondern lediglich eine Störung der Oxydationsfähigkeit für das Glucosemolekül zeigt, versuchte *Grafe* aus Kohlehydraten für den diabetischen Körper angreifbare Produkte zu erhalten.

Er erhitzte sowohl Trauben- als auch Rohrzucker bei einer den Schmelzpunkt dieser Substanzen nicht wesentlich übersteigenden Temperatur so lange, bis kein vergärbarer Zucker mehr nachzuweisen war. Es zeigte sich nun in der Tat, daß diese Substanzen auch beim schweren Diabetiker in großen Mengen (bis zu mehreren 100 g täglich) zugeführt, größtenteils resorbiert wurden, aber keine Erhöhung der Zuckerausscheidung zur Folge hatten. In vielen Fällen zeigte sich ein günstiger Einfluß auf bestehende Acidosis. Charakteristisch scheint von *Grafes* Beobachtungen besonders das Verhalten des Blutzuckers zu sein, welcher nach „Karamel" nicht oder nur unwesentlich anstieg. Die Gaswechselversuche *Grafes* zeigten teils eine spezifisch-dynamische Wirkung des „Karamels", teils eine Erhöhung des respiratorischen Quotienten.

Anschließend an seine Karamelversuche erwähnt *Grafe* ferner, daß auch hocherhitzte Mehlpräparate vom Diabetiker auffallend gut vertragen

---

[1]) Verhandl. d. deutsch. Kongr. f. inn. Med. **31**, 532, 1914; Münch. med. Wochenschr. 1914, Nr. 26, S. 1433; Deutsch. Arch. f. klin. Med. **116**, 437, 1914.

[2]) Unter dem Ausdruck Karamel versteht man bei erheblich höherer Temperatur aus den Zuckern entstehende Substanzen, die in den *Grafe*schen Produkten nur als Verunreinigung vorhanden gewesen sein können, wie schon *Gélis* in seiner weiter unten zitierten Arbeit von „mit Karamel verunreinigtem Glucosan" spricht.

werden, eine Beobachtung, die sich mit der schon seit langer Zeit bekannten Tatsache deckt, daß Brotrinde und scharf geröstetes Gebäck für die Zuckerkranken eine weit geeignetere Nahrung darstellen als z. B. frisches, weiches Brot.

Von den sonstigen Eigenschaften der „Karamele" hebt *Grafe*, wie schon oben erwähnt, die Nichtvergärbarkeit durch Hefe hervor, welche auch nicht durch Behandlung mit Darmfermenten oder Bakterien erreicht wird. Die optische Aktivität des Traubenzuckerkaramels („Carannose *Merck*") war fast die gleiche wie bei Glucose. Der Verbrennungswert der Substanzen lag etwas höher als bei den Zuckerarten (4,3 bis 4,6 Cal).

Welche Körper liegen nun den Karamelpräparaten zugrunde? *Grafe* glaubte seinerzeit, es mit hochmolekularen Polymerisationsprodukten der Zucker zu tun zu haben. Nachforschungen in der älteren Literatur ergaben folgendes: Bereits im Jahre 1859 beobachtete *Gélis*[1]), daß Rohrzucker beim schnellen Erhitzen über den Schmelzpunkt (160°) quantitativ in Glucose und ein Anhydrid der damals in fester Form noch nicht bekannten Lävulose (Glucose aus Inulin) gespalten wird, welches durch Hefe nicht vergärbar, von der Glucose also auf Grund dieser Eigenschaft getrennt werden konnte. Die Lösung des Anhydrids war schwach rechtsdrehend, Hydrolyse mit Mineralsäuren führte leicht zur Lävulose. Im nächsten Jahre zeigte *Gélis*[2]), daß Traubenzucker beim längeren Erhitzen auf 170° ein ebenfalls nicht vergärbares Anhydrid liefert. Es zeigte ungefähr die gleiche Rechtsdrehung wie Glucose und hatte im übrigen ähnliche Eigenschaften wie das Anhydrid der Lävulose. *Gélis* führte für diese Zuckeranhydride die Namen Glucosan und Lävulosan ein. Aus den letzten sechs Jahrzehnten finden sich nur noch ganz wenige kurze Angaben[3]) über das Anhydrid der Lävulose, auch öfters Fructosan genannt. Erst in den letzten vier Jahren ist von *Amé Pictet*[4]) und seinen Mitarbeitern das eingehende Studium dieser Körperklasse wieder aufgenommen worden. Außer den beiden oben erwähnten Zuckeranhydriden von *Gélis* erhielt *Pictet*[5]) das bisher nur als Glucosidkomponente[6]) bekannte Lävoglucosan bei der trockenen Vakuumdestillation von Stärke und Cellulose. *Karrer*[7]), welcher das Lävoglucosan auf gleichem Wege aus β-Glucose erhielt, charakterisierte es als Anhydrid dieses Zuckers. Für die Hinweise auf diese neueren Schweizer Arbeiten und die Beschaffung der Dissertation über das Lävoglucosan möchten wir Herrn Prof. *K. Freudenberg* unseren verbindlichsten Dank aussprechen.

Aus dem eben Besprochenen war uns klar, daß in dem Rohrzuckerkaramel *Grafes* im wesentlichen ein äquimolekulares Gemisch von α-Glucosan und Lävulosan vorliegen mußte, welches infolge Arbeitens an der Luft zum Teil durch Oxydationsprodukte usw. verunreinigt

[1]) C. r. **48**, 1062, 1859; A. ch. (3) **57**, 234.

[2]) C. r. **51**, 331, 1860.

[3]) *Hönig* und *Schubert*, M. **8**, 529, 1887; *Will* und *Lenze*, B. **31**, 68, 1898.

[4]) *Pictet* und *Castan*, Helv. **3**, 645; *Pictet* und *Reilly*, ebendaselbst **4**, 613.

[5]) *Pictet* und *Sarasin*, ebendaselbst **1**, 87; *Jean Sarasin*, Recherches sur la Cellulose et l'Amidon. Arch. soc. phys. et nat. (Genf) (4) **46** (5), 1918.

[6]) Tanret Bl. (3) **11**, 949, 1894; C. r. **119**, 158—161; B. **27**, Ref. 665; *Vongerichten* und *Müller* B. **39**, 241.

[7]) *Karrer*, Helv. **3**, 258.

war und daher auch sauer reagierte. Indem wir, wie *Pictet* im Vakuum arbeitend, den Rohrzucker erst bis zum Schmelzen erhitzten, dann die Temperatur mehrere Stunden auf 150° hielten, bekamen wir ein vollkommen neutrales Produkt. Der Wasserverlust entsprach genau einem Molekül, die beobachtete spezifische Drehung war $\alpha_{D 18} = + 41,21^0$, während sich aus *Pictets* Angaben für α-Glucosan (+ 69,79°) und Lävulosan (+ 19,0°) ein Mittelwert von + 44,4° berechnet hätte.

Es wurden also bei genügend langem Erhitzen von uns Produkte erhalten, welche nicht mehr gärfähig waren und die Eigenschaften eines Anhydridgemisches von Glucose und Lävulose zeigten. Vom Diabetiker wird nach den bisher vorliegenden Versuchen das Präparat gut vertragen, wobei zu erwähnen ist, daß möglichst hell gefärbte (karamelfreie) Präparate, bei denen eine längere Erhitzung über 160° möglichst vermieden wurde, keine Durchfälle erzeugen.

Das Traubenzuckerkaramel, insbesondere das anscheinend ziemlich reine Präparat von *Merck*, dessen Herstellungsweise uns nicht bekannt ist, stellt natürlich ein mehr oder weniger reines α-Glucosan dar. Von uns bzw. nach unseren Angaben im Vakuum bereitetes α-Glucosan, wobei zum Verarbeiten größerer Mengen Glucose die *Pictet*sche Methodik durch Einführung der Vakuumgasrührung mit Wasserstoff oder CO_2 ergänzt werden mußte, erwies sich nach den bisher vorliegenden Versuchen am Diabetiker als auch am pankreasdiabetischen Hunde als eine Substanz, welche den Blutzucker nicht oder wenig erhöht. Bei einem Falle von Schwerdiabetes war nach 70 g α-Glucosan nüchtern sogar eine deutliche Senkung des Blutzuckerspiegels zu beobachten, die stundenlang anhielt. Im übrigen hoffen wir, über eingehendere Versuchsreihen demnächst berichten zu können.

Was das Lävoglucosan anbetrifft, so vermuteten wir ursprünglich wegen der Entstehung dieses Körpers aus Stärke ein Vorhandensein desselben in hocherhitzten Mehlen, Zwiebäcken usw. Eingehende diesbezügliche Versuche ergaben aber, daß in besagten Substanzen Lävoglucosan nicht oder höchstens in Spuren vorhanden ist. Wegen der Löslichkeit des Lävoglucosans in heißem Aceton ist diese Probe recht einfach auszuführen. Nach *Pictet*[1]) bilden aber sowohl α-Glucosan wie Lävoglucosan unter geeigneten Bedingungen polymere Di- und Tetraglucosane. Ein Vorhandensein solcher Polymere in den erwähnten Mehlpräparaten wäre vielleicht möglich und müßte noch näher untersucht werden. Da hocherhitzte Mehle und Gebäcke keine Darmgärungen verursachen und deshalb auch für Darmkranke, insbesondere Säuglinge, viel verwendet werden, so schien es uns auch von Interesse, das Lävoglucosan in dieser Hinsicht zu prüfen. Im hiesigen hygienischen

---

[1]) *A. Pictet*, Helv. **1**, 226; *A.* u. *J. Pictet*, ebendaselbst **4**, 788.

Institut mit Herrn Geh. Rat *Hahn* und Herrn Dr. *Remy* im vorigen Jahre angestellte Versuche ergaben die Nichtvergärbarkeit des Lävoglucosans durch Koli auch bei Gegenwart von Duodenalsaft.

Im übrigen ist der eine von uns mit Herrn Prof. *Grafe* dahin übereingekommen, daß Herr Prof. *Grafe* die weitere biologische und klinische Prüfung des Lävoglucosans übernimmt, worüber er gleichzeitig an anderer Stelle berichtet, während wir uns die Bearbeitung des α-Glucosans und Lävulosans in dieser Hinsicht vorbehalten möchten.

Der Mechanismus der Glucosanwirkung beim Diabetiker ist vorläufig noch nicht geklärt. Unseres Erachtens bestehen zwei Möglichkeiten. Entweder werden die Glucosane im Gegensatz zur Glucose vom Diabetiker in einer noch unbekannten Weise direkt verbrannt, oder der diabetische Organismus ist vielleicht imstande, aus diesen Anhydridformen in der Leber Glykogen aufzubauen, wenigstens bis zu einem gewissen Grade zu fixieren und so den Kohlehydratstoffwechsel in andere Bahnen zu lenken. Eine Reihe von Erscheinungen scheint mehr für die letztere Anschauung zu sprechen. Die Auffassung, daß beim Diabetes nicht nur mangelhafte Fixation bzw. übermäßige Mobilisation, sondern auch gestörte Bildung des Leberglykogens vorliegt, ist wohl ziemlich allgemein verbreitet. In diesem Sinne wird jetzt ja auch die Insulinwirkung nicht nur als eine die Glykogenmobilisation hemmende, sondern auch als eine die Glykogenbildung fördernde betrachtet. Ferner gehört hierhin das Verhalten der Lävulose, welche als besserer Glykogenbildner jedenfalls doch bis zu einem gewissen Maße vom Diabetiker und pankreasdiabetischen Hunde ausgenutzt werden kann. Da die Lävulose schon bei viel tieferer Temperatur (115°) als die Glucose (160°) in ihr Anhydrid übergeht, so scheint uns der Gedanke nicht von der Hand zu weisen zu sein, daß der diabetische Organismus trotz Mangel an geeignetem Ferment die Energie zu dieser Anhydridbildung noch aufbringt. Jedenfalls hat jeder Glykogenbildung eine Anhydridbildung vorauszugehen. Der geringe Anstieg des Blutzuckers nach Lävulose im Vergleich zu Glucose scheint uns auch durch eine schnellere Anhydridbildung besser erklärt als durch eine leichtere Verbrennbarkeit der Lävulose an sich, wie *Bornstein*[1]) annimmt. Es ist hier nicht der geeignete Ort, die alte Frage erschöpfend zu diskutieren, ob nicht überhaupt auch beim Ruhestoffwechsel der normale Abbau der Kohlehydrate über die Glykogenstufe verläuft.

Genauere Aufschlüsse über die Glucosanwirkung können natürlich nur sehr eingehende Tierversuche bringen, die zurzeit noch im Gange sind.

---

[1]) Diese Zeitschr. **130**, 216, 1922.

Über fluoreszierende Oxydationsprodukte des Bilirubins und deren Bedeutung als Fehlerquelle bei dem üblichen Urobilinnachweis[1].

(Bemerkungen zu der Arbeit von *Barrenscheen* und *Weltmann*.)

Von

A. Adler.

(Aus der medizinischen Universitätsklinik in Leipzig.)

(Eingegangen am 25. Oktober 1923.)

Die Autoren glauben, den von mir mitgeteilten positiven Befund von *Urobilin* in menschlicher Fistelgalle bei Patienten, bei denen keine Galle in den Darm gelangte, leichthin damit abtun zu können, daß sie angeben, ihn „als Täuschung auffassen" zu müssen. Sie vermuten, es könne sich hierbei um ein Oxydationsprodukt des Bilirubins gehandelt haben, entstanden durch Benutzung von Jodtinktur zum Urobilinnachweis. Diese *Annahme* ist eine *durchaus irrige*. Die positive Reaktion ist erhalten *ohne* Jodzusatz, wie ich überhaupt schon bald nach Beginn meiner Untersuchungen den Jodzusatz zur Prüfung auf Urobilin in bilirubinhaltigen Medien streng vermieden habe. Der *positive* Urobilinbefund in jener Galle beruht somit *nicht* auf „Täuschung", und das *Vorhandensein* dieses Farbstoffes im vorliegenden Falle läßt nach wie vor *keine andere* Deutung zu als die dort gegebene, zumal deshalb, weil es sich um *ganz frisch* entleerte und *sofort* untersuchte Galle handelte nach vorheriger Verwerfung des unmittelbar vorher sezernierten Teiles. Diese Auslassungen der Autoren sind um so verwunderlicher, als der eine (*Weltmann*) durch eine gelegentlich des Wiener Internistenkongresses stattgehabten Unterredung, also vor Einsendung des Manuskriptes von der oben bemerkten Tatsache unterrichtet gewesen ist, daß die gemachte Voraussetzung, es könnte infolge Verwendung von Jodtinktur ein fluoreszierendes Oxydationsprodukt des Bilirubins Urobilin vorgetäuscht haben, *nicht* zutrifft. Zu gleicher Zeit habe ich Herrn *Weltmann* auch mitgeteilt, daß nach meinen Untersuchungen in Harnen diese Umwandlung des Gallenfarbstoffes zu seinem fluoreszierenden Oxydationsprodukt nicht zu beobachten ist, was die Autoren in ihrer Arbeit jetzt auch bringen. Auch auf Galle gerichtete Untersuchungen haben mir *keineswegs* eine Bestätigung der Angaben der Autoren gebracht, daß in *allen* Gallen diese Umwandlung des Bilirubins in sein fluoreszierendes Oxydationsprodukt möglich ist. Auf Einzelheiten einzugehen, ist hier nicht

---

[1]) Diese Zeitschr. **140**, 278.

der Platz, ebenso wie ich mir versagen muß, auf andere Unrichtigkeiten der Ausführungen, wie, ich hätte „die alte *Hayem*sche Anschauung in neuer Form" wieder gebracht, mich hier länger einzulassen. Ich werde in einer späteren Mitteilung Gelegenheit nehmen, darauf zurückzukommen[1]). Wenn ich in meiner ersten Mitteilung[2]) über die Methodik des Urobilinnachweises über Duodenalsaft- und Gallenuntersuchungen berichtet habe, die *mit Jod*zusatz ausgeführt worden sind, so habe ich diese Methode alsbald wieder verlassen, als sich Schwierigkeiten in der Beurteilung ergaben, und auch von vornherein wurden diese Untersuchungen nur mit der dort in der Fußnote (l. c., S. 319) erwähnten Methode *ohne* Jodtinkturzusatz im Vergleich ausgeführt. Diese methodische Handhabung des Urobilinnachweises in bilirubinhaltigen Flüssigkeiten *ohne* Jodtinktur zu betonen, habe ich in meinen Arbeiten seitdem noch nicht Gelegenheit genommen. Sie sind aber bereits ausdrücklich mitgeteilt auf meine Veranlassung in den beiden Dissertationen aus unserer Klinik von *Sachs*, „Über vergleichende Urobilinuntersuchungen im Duodenalsaft, Stuhl und Harn bei Krankheiten", und von *Tützer*, „Der Urobilingehalt des Stuhles und Harns nach einseitiger Ernährung". Leipzig 1922 und 1923.

Da in meinen Untersuchungen Jodtinktur nur in bilirubin*freien* Flüssigkeiten zum Urobilinnachweis verwandt wurde, so bleiben die von mir mitgeteilten Untersuchungsergebnisse von den Auslassungen der Autoren *völlig* unberührt. Meine Resultate bleiben also, entgegen der Annahme der Autoren, zu Recht bestehen.

---

[1]) Dort werde ich auch die in Frage kommenden Untersuchungsprotokolle ausführlich mitteilen.

[2]) Deutsch. Arch. f. klin. Med. **138**, 312.

Über die Resorption von Lecithin.

Von

Fritz Eichholtz.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Freiburg.)

(Eingegangen am 26. Oktober 1923.)

Nach den Arbeiten von *Bloor*[1]), *Geiger* und *Loewi*[2]), *Winterstein* und *Hecker*[3]) steht das Lecithin wieder einmal im Brennpunkt des Interesses. Von allen Seiten her ringt man um das Verständnis dieser merkwürdigen Substanz, die bis heute einer restlosen chemischen Analyse getrotzt hat, und mit der im System der physiologischen Kenntnisse kaum etwas anzufangen war.

Die Schwierigkeiten, die der Physiologie des Lecithins entgegenstehen, sind sicher zum größten Teil darin begründet, daß man in keinem Fall eine chemisch restlos identifizierte Substanz vor sich hat. Man schwankt zwischen unreinen Präparaten, die alle möglichen Ballaststoffe mit sich schleppen, und zwischen teilweise zersetzten Präparaten, bei denen die Lecithinwirkung in unübersehbarer Weise durch Spaltungs- und Oxydationsprodukte kompliziert wird.

Dank dem Entgegenkommen der Firma Witte, Rostock, standen mir nun größere Mengen eines Handelspräparates zur Verfügung, das mit außerordentlich milden Mitteln gewonnen wird, von dem man infolgedessen annehmen kann, daß es das Lecithin in unverändertem Zustande enthält.

Es sollte nun entschieden werden, in welcher Form sich das verfütterte Lecithin im Blute wiederfindet.

Es besteht kein Zweifel darüber, daß das verfütterte Lecithin sehr rasch resorbiert wird. Verschiedene Autoren haben festgestellt, [*Slotzow*[4]), *Usuki*[5])], daß sich im Darmkanal kein Lecithin mehr nach-

[1]) *W. R. Bloor*, Journ. of biol. Chem. **45**, 171, 1920; daselbst weitere Literatur.

[2]) *E. Geiger* und *O. Loewi*, diese Zeitschr. **127**, 174, 1922.

[3]) Siehe bei *E. Hecker*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **129**, **205**, **1923**.

[4]) *Slotzow*, Hofmeisters Beitr. **7**, 509, 1906.

[5]) *Usuki*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **63**, 270, 1910.

weisen läßt, daß es also bereits im Magen oder spätestens im Duodenum gespalten bzw. resorbiert wird. Dagegen erscheint es fraglich, ob der Resorption eine völlige Aufspaltung vorhergehen muß. Man begnügte sich bei dieser Frage mit der Feststellung, daß im Magen-Darmkanal Fermente festzustellen sind, die Lecithin in seine Bruchstücke zu spalten vermögen. Man zog daraus den Schluß, daß nun auch das gesamte Lecithin vor der Resorption in Cholin, Fettsäuren und Glycerinphosphorsäure gespalten und daß es erst in Form der Bruchstücke resorbiert werden könnte.

Während nun die Synthese der Fette aus ihren Bruchstücken als eine naheliegende und unkomplizierte Funktion erscheint, ist die des Lecithins weitaus verwickelter, und es erscheint äußerst unwahrscheinlich, daß der Organismus, wenn eine Spaltung in die letzten Bruchstücke vorausgegangen ist, nicht zunächst näher liegende Synthesen wie die des Neutralfettes ausführt, oder freies Cholin oder freie Glycerinphosphorsäure als solche resorbiert.

Man wird also aus einer Untersuchung der lipoidlöslichen Substanzen im Blute unter Umständen Anhaltspunkte dafür gewinnen, ob in der Tat eine völlige Aufspaltung des Lecithinmoleküls der Resorption vorhergehen muß. Dabei erscheint eine Bestimmung des freien Cholins von geringer Bedeutung, da schon *Reid Hunt*[1]) nachweist, daß das Cholin sehr schnell aus dem Kreislauf verschwindet. Der Nachweis der Glycerinphosphorsäure ist zurzeit mikroanalytisch unmöglich, die vorliegenden Untersuchungen beschränken sich daher darauf, die Veränderungen des äther-alkohollöslichen Phosphors sowie der Gesamtfettsäuren nach Lecithinfütterung zu verfolgen.

Der Nachweis des Lecithins begegnet aus den verschiedensten Gründen größeren Schwierigkeiten; denn seit den Arbeiten von *Erlandsen*[2]), *Heubner*[3]) und *Levene*[4]) ist bekannt, daß hier ein außerordentlich labiles Molekül vorliegt, das schon bei den harmlosesten chemischen Eingriffen teilweise zersetzt wird. Aus den Untersuchungen von *Levene* geht weiter hervor, daß das Lecithin im Organismus eng vergesellschaftet ist mit anderen phosphorhaltigen Lipoiden, und die Methodik von *Bloor*[5]), die hier übernommen wurde, erscheint nicht mehr geeignet, exakte quantitative Lecithinwerte zu liefern. Immerhin wird man als gesichert hinnehmen, daß eine Steigerung des ätheralkohollöslichen Phosphors im Blute nach Fütterung mit Lecithin auf die Vermehrung dieser Substanz im Blute bezogen werden muß,

[1]) *Reid Hunt*, Journ. of pharm. and exper. Therap. **7**, 301, 1915.
[2]) *A. Erlandsen*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **51**, 71, 1907.
[3]) *W. Heubner*, Zeitschr. f. exper. Path. u. Pharm. **59**, 420, 1908.
[4]) *P. A. Levene* und *C. J. West*, Journ. of biol. Chem. **34**, 175, 1918.
[5]) *W. R. Bloor*, ebendaselbst **36**, 33, 1918; **23**, 317, 1915.

um so mehr, als die möglicherweise in größeren Mengen entstehende Glycerinphosphorsäure nicht äther-alkohollöslich ist.

Es wurde also in einer Reihe von Versuchen festgestellt, ob und in welchem Ausmaße der Spiegel des äther-alkohollöslichen Phosphors im Blute durch Fütterung mit Lecithin erhöht wird, und in welchem Maße an dieser Erhöhung der Gesamtfettsäurespiegel beteiligt ist.

Zu diesem Zwecke wurden vier junge Hunde mit Witte-Lecithin gefüttert. Die Tiere hatten 24 Stunden vorher gehungert. Kurz vor der Zuführung von Lecithin, sowie 2, 4, 6 Stunden nachher wurde aus der vorher präparierten Halsvene je 3 ccm Blut entnommen und nach *Bloor* im Äther-Alkoholextrakt Lecithin und Gesamtfettsäure bestimmt.

Hund	Datum	Gewicht	Menge des verfütterten Lecithins	g Lecithin in 100 ccm Blut				mg Fett in 100 ccm Blut			
				vorher	2 Std.	4 Std.	6 Std.	vorher	2 Std.	4 Std.	6 Std.
1	16. VII.	2,5	40 g	0,27	0,34	0,38	0,31	0,60	0,60	0,63	0,63
2	20. VII.	2,7	40 „	0,38	0,42	0,40	0,39	0,54	0,60	0,66	0,63
3	29. X.	3,1	40 „	0,29	0,35	0,37	0,33	0,69	0.75	0,72	0.72

Ein vierter Versuch ergab im Prinzip das gleiche Resultat.

Aus der Tabelle geht hervor, daß bei Verfütterung von Lecithin an junge Hunde im Blute eine Erhöhung des Spiegels des äther-alkohollöslichen Phosphors stattfindet, während demgegenüber der Fettgehalt nur unwesentlich gesteigert ist.

Im Gegensatz zu diesen Versuchen über Lecithinresorption seien kurz die Blutfettwerte wiedergegeben, die *Bloor*[1]) nach Verfütterung von Olivenöl erhielt.

	Hund 1		Hund 2		Hund 3		
Gewicht in kg . .	8,35	—	8,88	—	17,00	—	—
Olivenöl in ccm . .	50	60	55	55	100	100	100
	g Fett in 100 ccm Blut						
Vorher	0,52	0,63	0,53	0,53	0,63	0,68	0,64
Nach 2 Std. . . .	0,63	0,69	0,59	0,57	0,76	0,80	0,62
„ 4 „ . . .	0,97	0,72	0,71	0,75	0,93	1,08	0,90
„ 6 „ . . .	0,68	0,77	0,58	0,75	0,83	0,89	0,73
„ 8 „ . . .	0,71	0,76	0,61	0,70	0,90	0,95	0,81

Ein Vergleich mit den obigen Lecithinwerten ergibt, daß nach Fettfütterung bedeutend stärkere Erhöhungen der Blutfettwerte beobachtet wurden, trotzdem es sich bei den Lecithintieren um junge

[1]) *W. R Bloor,* Journ. of biol. Chem. **24**, 447, 1916.

Exemplare handelte und obwohl die Lecithinmenge pro Kilogramm Hund größer als die relativen Fettmengen waren.

Es lassen sich demnach aus der Analyse des Blutes folgende Schlüsse ziehen:

Die naheliegende Synthese der aus dem Lecithinmolekül herausgebrochenen Fettsäuren zu Neutralfett findet nur in geringem Umfange statt.

Ein weitaus größerer Teil des verfütterten Lecithins findet sich als äther-alkohollösliche, phosphorhaltige Substanz im Blute wieder.

Von den verfütterten Lecithinmengen werden nur minimale Bruchteile im Blute wiedergefunden. Ob die Hauptmenge auf dem Pfortaderwege in der Leber abgelagert wird, bedarf weiterer Untersuchung.

Über die Anwesenheit von Vitamin A in Handelslecithin.

Von

Fritz Eichholtz.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Freiburg i. Br.)

(Eingegangen am 26. Oktober 1923.)

Im Verlaufe von Untersuchungen, die an anderer Stelle veröffentlicht werden, entstand die Frage, ob gewisse Beobachtungen vielleicht auf der Anwesenheit von Vitaminen beruhen könnten. Diese Frage gewinnt ein allgemeines Interesse, weil die Gegenwart einer Substanz von der physiologischen Aktivität der Vitamine die vielen Versuche über die therapeutische Wirkung des Lecithins erheblich komplizieren wird. Allerdings gibt *Stepp*[1]) an, daß er die Ausfallserscheinungen, die er nach Fütterung mit insuffizienter Nahrung beobachtet, durch Darreichung von Lecithin nicht beheben kann. Aber es ist bekannt, daß die Handelspräparate sehr ungleichwertig sind. *Erlandsen*[2]) hat nachgewiesen, daß schon durch die einfache Cadmiumchloridfällung Veränderungen im Molekül vor sich gehen, die es zweifelhaft machen, ob derartige Substanzen überhaupt noch als Lecithin bezeichnet werden können, andererseits leiden die Präparate, die, wie das Lecithin *Witte*, mit milden Mitteln hergestellt werden und bei denen man annehmen kann, daß ein Aufbrechen des Moleküls nicht stattgefunden hat, unter dem Übelstande, daß gewisse Begleitsubstanzen nicht entfernt werden. Es liegt nahe anzunehmen, daß zu diesen Begleitsubstanzen auch Vitamine gehören.

Die vorliegende Substanz wurde nach der *Stepp*schen Methode auf Vitamin A untersucht. Die Tiere (weiße Mäuse) wurden mit einer Weißbrot-Milchmischung gefüttert, die in der angegebenen Weise mit Äther und Alkohol extrahiert worden war[3]).

Ob tatsächlich bei der *Stepp*schen Methode die Tiere an einem Mangel an fettlöslichem Vitamin A zugrunde gehen, bleibt dahingestellt.

---

[1]) *W. Stepp*, Zeitschr. f. Biol. **57**, 135, 1912.

[2]) *A. Erlandsen*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **51**, 71, 1907.

[3]) Herr Dr. *Dragendorf* hatte die Güte, mich bei den Versuchen zu unterstützen.

Wir wissen aus den Arbeiten von *Mellanby*[1]), daß das sogenannte Vitamin A aus verschiedenen organischen Faktoren besteht, die eng miteinander verknüpft sind, aber verschiedene Ausfallserscheinungen veranlassen.

Die Tiere wollten zunächst nicht ansprechen, da anscheinend die Extraktion ungenügend war. Erst nachdem die Extraktion mit allen Kautelen stattgefunden hatte, gingen die Kontrolltiere unter allmählicher Abmagerung zugrunde.

Es wurden vier Serien zu je sechs Tieren angesetzt. Das Gewicht der Tiere schwankte zwischen 16 und 22,5 g.

Die Serien erhielten folgendes Futter:

Serie 1. Milch und Weizenmehl, 20 Stunden mit 96proz. Alkohol, 50 Stunden mit Äther, 20 Stunden mit 96proz. Alkohol extrahiert.

Serie 2. Desgleichen mit Zusatz von Lecithin 1 : 10.

Serie 3. Desgleichen mit Zusatz von Alkoholextrakt 1 : 10.

Serie 4. Normaltiere unter Weizenmehl-Milchkost. Der Versuch wurde am 60. Tage abgebrochen.

Die Lebensdauer der Tiere in Tagen betrug:

Serie 1. Tier Nr. 1 = 46, Nr. 2 = 47, Nr. 3 = 37, Nr. 4 = 37, Nr. 5 = 51, Nr. 6 = 52.

Serie 2. Tier Nr. 5 geht am 22. Tage ein, die anderen überleben.

Serie 3. Tier Nr. 2 geht am 26. Tage, Tier Nr. 4 am 46. Tage ein, die anderen überleben.

Serie 4. Tier Nr. 3 geht am 47. Tage ein, die anderen überleben.

Außer dem Ausfall von Tier Nr. 5, das, wie aus dem Vergleich mit den Serien 3 und 4 hervorgeht, an einer interkurrenten Erkrankung zugrunde gegangen sein wird, überleben sämtliche Lecithintiere.

Das Lecithin Witte enthält demnach Vitamin A.

Dieser Befund entspricht den Erwartungen, da hier ein Lecithin vorliegt, das mit außerordentlich milden Mitteln hergestellt wird. Er erscheint insofern von allgemeinerem Interesse, als physiologische Untersuchungen über Lecithinwirkung unter Umständen mit einer gleichzeitigen Vitaminfunktion zu rechnen haben.

---

[1]) *E. Mellanby*, Lancet-Band 198, Nr. 16, S. 856, 1920.

Über den Einfluß von Phosphat und Bicarbonat auf die Dissoziation des Kalkes im Liquor cerebrospinalis.

Von

H. Behrendt.

(Aus der Marburger Universitäts-Kinderklinik.)

(Eingegangen am 28. Oktober 1923.)

Da die direkte Messung der Ca-Ionenkonzentration im Blute eine methodisch noch nicht gelöste Aufgabe darstellt, wurde versucht, den Liquor cerebrospinalis für diese Untersuchungen zu benutzen. Die Voraussetzung, daß Änderungen der Ionenkonzentration im Blute auch in der Lumbalflüssigkeit entsprechend zum Ausdruck kommen müßten, war hierbei allerdings erst zu prüfen. Es war möglich, daß bei Tetaniefällen die im Blute theoretisch angenommenen Veränderungen (Ca-Ionenverminderung) im Liquor einem experimentellen Nachweis zugänglich wären, der einwandfreier als die bisher gebrauchten biologischen Methoden arbeitete. Auch methodische Erwägungen führten zur Wahl des Liquors, weil er im Gegensatz zum Blute ohne vorherige Ultrafiltration und dadurch erforderliche Korrektion der CO_2-Spannung direkt zur Messung verwendet werden konnte.

Methodisches.

Die einzige bisher bekannte Methode zur Messung der Ca-Ionenkonzentration von *Brinkman* und *van Dam*[1]) erwies sich auch für den Liquor als brauchbar und zuverlässig[2]). Es war notwendig, eine Möglichkeit zu finden, auch ohne Nephelometer in kleinen Flüssigkeitsmengen das Auftreten des ersten Trübungsgrades exakt feststellen zu können.

Hierzu wurde folgende, im Prinzip dem Nephelometer nachgebildete Apparatur geschaffen. In einem rechteckigen, innen schwarz gestrichenen Holzkasten werden zwei kleine, 5 ccm fassende, 9 cm lange und 0,8 cm weite Glasgefäße so montiert, daß sie wagerecht von dem Lichte der hinter einer mattierten Glasplatte befestigten Glühbirne getroffen werden und

[1]) *Brinkman* und *van Dam*, Kon. Akad. van Wetenschappen te Amsterdam; Proceedings 22, Nr. 7, 1920.

[2]) Die Grundlagen dieser Methode werden als bekannt vorausgesetzt.

das Tyndallphänomen von oben her durch den mit entsprechendem Ausschnitt und Aufsatz versehenen geschlossenen Deckel beobachtet werden kann. Man erhält auf diese Art sehr klare Bilder und ist bei einiger Übung imstande, den geringsten trüben Hauch festzustellen. *Es kam nur darauf an, Klarheit und erste Trübung zu unterscheiden, nicht aber Trübungsgrade zu messen.* Der Liquor wurde unter Paraffin aufgefangen, ohne mit der atmosphärischen Luft in Berührung zu kommen. Dies gelingt entweder dadurch, daß man an die Lumbalnadel eine rechtwinklig nach unten gebogene Glaskapillare montiert, deren Auslauf unter Paraffin mündet, oder aber man bedient sich einfacher einer in die Lumbalkanüle passenden Spritze, saugt ganz langsam den Liquor an und bringt ihn mittels einer neu aufgesetzten langen Kanüle an den Boden eines nur wenig Paraffin enthaltenden Zentrifugenröhrchens; hierin kann dann im Falle einer Trübung (Meningitis) gleich durch Zentrifugieren eine Klärung bewirkt werden. Wir haben übrigens stets auch für das freie Auge klaren Liquor zentrifugiert. Von dem Liquor werden je 3 ccm mittels einer kapillar ausgezogenen Pipette durch die Paraffinschicht hindurch entnommen und in die beiden Untersuchungsgefäße gebracht. Eines dient zum Vergleich, in das andere werden von einer genau analysierten, etwa m/100 Ammoniumoxalatlösung so viel $^1/_{100}$ ccm hinzugesetzt, bis die erste, bei weiterem Zusatz sich verstärkende Trübung auftritt. Für gleichmäßige Verteilung des Oxalats muß durch mechanische Erschütterung des Gläschens Sorge getragen werden. Ganz geringe, von vornherein bestehende Trübung des Liquors stört nicht, stärkere Grade aber machen eine exakte Messung unmöglich, da dann erst große Differenzen zwischen den beiden Gläschen sinnfällig werden. Die ganze Bestimmung dauert höchstens 3 bis 5 Minuten. Trotzdem findet eine kleine, aber doch meßbare Änderung von p_H infolge von CO_2-Verdunstung auch bei raschem Arbeiten statt, so daß stets erst unmittelbar nach Feststellung der Trübungsgrenze in beiden Röhrchen das End-p_H gemessen wurde [nach der kolorimetrischen Methode von *Michaelis*[1])]. Ist wenig Liquor vorhanden, so kann man den zur kolorimetrischen p_H-Bestimmung benutzten Liquor + Indikator unter quantitativem Nachspülen der beiden benutzten Gefäße auch noch zur Gesamt-Ca-Bestimmung verwenden. Diese wurde nach der Methode von *de Waard*[2]) ausgeführt, und zwar meist in 3 ccm Liquor. Die Phosphatbestimmung erfolgte nach der Methode von *Haessler* und *Marriot*[3]).

Die Berechnung der Ca-Ionenmenge aus den verbrauchten Kubikzentimetern Oxalat geschieht unter Zugrundelegung des von *Brinkman* und *van Dam* ermittelten Löslichkeits- oder Ionenproduktes von $Ca^{\cdot\cdot}$ und $C_2O_4^{\prime\prime}$, das auch wir in Versuchen an reinen Salzlösungen, die noch nicht abgeschlossen sind, bestätigt fanden. Es beträgt 0,056 bis 0,057. Sind z. B. bei Verwendung von 3 ccm Liquor 0,08 ccm einer m/100 Ammoniumoxalatlösung bis zum Auftreten der ersten Trübung verbraucht, dann entspricht das einer Oxalatkonzentration von 0,08 . 0,01 . 333 Millimol C_2O_4 im Liter = 0,266 Millimol pro Liter. Dann ist die $Ca^{\cdot\cdot}$-Menge:

$$\frac{\text{Löslichkeitsprodukt}}{0{,}266} = \frac{0{,}057}{0{,}266} = 0{,}214\,\text{mM Ca}^{\cdot\cdot} \text{ pro Liter,}$$

das entspricht 0,856 mg-Proz. $Ca^{\cdot\cdot}$.

---

[1]) Deutsch. med. Wochenschr. 1921, Nr. 17, S. 465.

[2]) Diese Zeitschr. **97**, 1919.

[3]) Journ. of biol. Chem. **32**, 233, 1917.

Die erste Gruppe der untersuchten Lumbalflüssigkeiten stammte von gesunden Kindern oder solchen ohne Erkrankung des Nervensystems. Hier wurden die ersten Werte erhoben und zunächst als Normalzahlen festgelegt. Aus der Tabelle I ist ersichtlich, daß mit Schwankungen nach oben und unten die Menge des ionisierten Kalkes im Mittel 20 Proz. des Gesamtkalkes beträgt, also prozentisch ebensoviel wie im Serum [*Rona* und *Takahashi*[1]), *Brinkman* und *van Dam*[2])]. Die absoluten Durchschnittswerte betragen für den Gesamt-Ca-Gehalt in Übereinstimmung mit *Leichers*[3]) Ergebnissen, aber im Gegensatz zu *Brocks*[4]) höheren Zahlen 5 mg-Proz., davon sind 1 mg-Proz. Ionen. Beide Anteile sind also etwa halb so groß wie die entsprechenden Werte im Serum. Die Angaben von *Richter-Quittner*[5]) über große Schwankungen, ja Fehlen des Kalkes im Liquor werden also nicht bestätigt. Die aus klinischen Indikationen lumbalpunktierten Säuglinge mit cerebralen Erkrankungen wiesen nun in ihrem Liquor ganz gleiche Ionisationsverhältnisse des Kalkes auf, so daß weiterhin auf die ausschließliche Untersuchung des Liquors gesunder Kinder verzichtet werden konnte. Selbst bei tuberkulöser Meningitis waren die Werte für den ionisierten Anteil des Kalkes normal. Der niedrigste Wert war 16 Proz., der höchste 23,1 Proz. Da aber die Größenordnung, in welcher die absoluten Mengen sich bewegen, sehr klein und die Fehlergrenze der Methodik doch auch mit 2 bis 3 Proz. zu veranschlagen ist, so kann man sagen, daß die *Calciumionenkonzentration im Liquor cerebrospinalis ziemliche Konstanz aufweist.* Da nach den Untersuchungen *Leichers* und nach eigenen ganz gleichen Erfahrungen die Gesamtcalciumwerte des Liquors selbst dann normal bleiben, wenn im Blutserum eine Abnahme des Gesamtkalkes festzustellen ist, so ist die Konstanz auch des prozentualen Anteils an ionisiertem Kalk durchaus verständlich. Es war daher nicht erstaunlich, daß auch bei der kindlichen Tetanie in Fällen, wo eine starke Abnahme des Gesamtkalkes im Serum vorlag, keine Änderung in dem Kalkgehalt des Liquors nachzuweisen war, weder im dissoziierten Anteil, noch in der Gesamtmenge. Allerdings sind einige Ausnahmen zu vermerken, so Versuch Nr. 9 und 23. Da aber einmal eine starke Abnahme, im anderen Falle eine Vermehrung des ionisierten Kalkanteils um fast das Doppelte vorliegt, so lassen sich irgendwelche Schlüsse hieraus nicht ziehen. Die beiden niedrigen Werte des ionisierten Anteils in den Versuchen 14 und 28 sind durch die deutlich gesunkene Acidität erklärt, wie weiter unten gezeigt werden wird.

---

[1]) Diese Zeitschr. **49**, 370, 1913.
[2]) l. c.
[3]) Deutsch. Arch. f. klin. Med. **141**, 196, 1923.
[4]) Diese Zeitschr. **140**, 591, 1923.
[5]) Ebendaselbst S. 133, 1923.

Tabelle I.

Versuchs-Nr.	Alter	Diagnose	p_H	Gesamt-Ca mg-Proz.	Ca·· mg-Proz.	Ca·· in Proz. des Gesamt-Ca	Gesamt-Ca im Serum
3	2 Jahr	Anämie	—	3,96	0,84	21,2	—
4	6 Monat	Gesund	—	3,63	0,84	23,1	—
5	2 Jahr	„	—	4,62	0,96	20,8	—
20	$7^1/_2$ Mon.	„	7,6	4,9	0,96	19,6	11,2
24	8 „	l. Hydroceph.	7,75	4,9	0,96	19,6	—
25	8 „	„ „	7,7	5,2	0,96	18,5	—
1	3 Jahr	Idiotie	—	4,62	0,76	16,0	—
12	11 Monat	Mening. ser.	—	5,9	1,3	22,7	—
19	11 „	Hydroceph.	7,7	4,8	0,96	20,0	—
15	8 Jahr	Mening. tbc.	7,5	5,5	1,14	20,7	—
16	$1^1/_4$ „	„ epid.	—	5,6	—	—	—
26	$5^1/_2$ „	Lues cong.	7,7	5,2	1,14	21,9	—
		Im Mittel .	7,66	4,90	0,98	20,4	—
7	6 Mon.	Prätetanoid	—	4,55	0,96	21,0	8,8 mg-Proz.
9	—	Lat. Tetanie	—	4,8	0,51	10,8	8,4
14	5 Mon.	Tetanie	7,9	4,88	0,76	15,6	6,2
17	12 „	„	—	5,1	—	—	6,8
23	7 „	„	7,65	4,0	1,72	39,1	4,4
27	7 „	Tetanie geheilt	7,7	4,95	1,42	28,6	9,7
28	9 „	Tetanie	7,9	5,07	0,76	15,0	7,2
6	2 „	Phosph.-Tetanie	—	5,5	1,14	20,5	12,0
11	5 „	„ „	—	3,86	0,88	22,8	10,1
		Im Mittel .	7,78	4,75	1,07	21,7	—

Es scheint also die Annahme nicht erlaubt zu sein, daß Änderungen der Ionenkonzentration im Blute auch in der Lumbalflüssigkeit entsprechend zum Ausdruck kommen, wie dies ja auch für Anelektrolyte gilt. Es ist also nicht möglich, die z. B. bei Tetaniefällen im Blute theoretisch angenommenen Veränderungen auf den Liquor zu übertragen und hier einem experimentellen Nachweis zugänglich zu machen. Die in dieser Richtung vorliegenden Untersuchungen über das Säurebasengleichgewicht im Liquor bei Tetanie [*Balint*[1]), *Brock*[2])] sind entsprechend zu bewerten.

Läßt man frisch gewonnenen Liquor in offenem, flachem Gefäß an der Luft stehen, so steigt durch Entweichen der CO_2 sein Wasserstoffexponent innerhalb weniger Stunden auf über 8,4 an, wenn er vorher etwa 7,6 betragen hat. Bestimmt man in beiden Fällen die Ca-Ionen, so sind die Werte ganz wesentlich verschieden. In der alkalischen Portion ist die Ionisation sehr stark zurückgedrängt gegenüber der ursprünglichen, luftgeschützten Portion. Wie Tabelle II zeigt, verschwindet diese Differenz wieder, wenn man durch n/10 HCl-Zusatz

---

1) Monatsschr. f. Kinderheilk. **25**, 1, 1923.

2) Diese Zeitschr. **140**, 591, 1923.

Tabelle II.

Versuchs-Nr.	Art des Liquors (je 3 ccm)	Bis zur Trübung gebrauchte m/100 Oxalatmengen	Ca-Ionen mg-Proz.	p_H
1	genuin	0,05 ccm	1,36	—
	abgestanden	0,075 „	0,91	—
2	genuin	0,09 „	0,76	7,65
	abgestanden u. reduziert	0,11 „	0,63	7,65
	abgestanden	—	—	8,2
3	genuin	0,09 „	0,76	7,9
	abgestanden	0,135 „	> 0,52	> 8,4
	reduziert	0,08 „	0,88	7,9
4	genuin	0,06 „	1,14	7,5
	abgestanden	0,1 „	0,68	> 8,4
	reduziert	0,06 „	1,14	7,6
5	genuin	0,07 „	0,96	7,7
	abgestanden	0,11 „	0,52	> 8,4
	reduziert	0,06 „	1,14	7,7
6	genuin	0,07 „	0,96	7,6
	abgestanden	0,12 „	0,57	> 8,4
	reduziert	0,08 „	0,84	7,7
7	abgestanden	0,2 „	0,34	> 8,4
	unvollständig reduziert	0,14 „	0,48	8,1
	„ „	0,13 „	0,53	8,0

die aktuelle Acidität des CO_2-verarmten Liquors wieder auf das Ausgangs-p_H zurückbringt (unter kolorimetrischer Kontrolle). *Aus diesen Versuchen geht eindeutig der Einfluß der verschiedenen* $[H^+]$ *auf die Ca-Dissoziation hervor. Bei echter Acidosis eine Steigerung, bei echter Alkalosis eine Verminderung der Ca-Ionen.* Über den Einfluß der Bicarbonatverminderung bei konstanter $[H^+]$ (kompensierte Acidose) lassen diese Untersuchungen wegen der nicht genügend scharfen Bestimmung von p_H keine Schlüsse zu, wobei die Kleinheit der Schwankungen der Ammonoxalatmenge im Verhältnis zu der daraus berechneten Ca^{++}-Änderung erschwerend wirkt.

Die kürzlich von *Brock*[1]) mitgeteilten Befunde über die Ca-Ionisation im kindlichen Liquor weichen von den eben mitgeteilten Resultaten nicht sehr erheblich ab. Sein Wert von durchschnittlich 1,9 mg-Proz. $Ca^{\cdot\cdot}$ ist aus der $[H^+]$ (= 7,53) und der aus der CO_2-Kapazität errechneten Bicarbonatkonzentration unter Verwendung der Formel von *Rona* und *Takahashi*[2]) gewonnen. Es sei ausdrücklich zugegeben, daß der Liquor, in dem wir $Ca^{\cdot\cdot}$ direkt bestimmten, nicht mehr als vollkommen „genuin" bezeichnet werden kann, da ja sein p_H

[1]) l. c.
[2]) l. c.

durch den Zeitverzug während der Messung etwas größer war als in corpore. Und wenn man der Rechnung *Brocks* statt $p_H = 7,53$ die in unseren Messungen meist herrschende Acidität von $p_H = 7,7$ zugrunde legt, so kommt man schon auf einen Wert von 1,27 mg-Proz. $Ca^{\cdot\cdot}$, so daß also tatsächlich nur die geringe Differenz von 0,27 mg-Proz. $Ca^{\cdot\cdot}$ zwischen Messung und Rechnung besteht, wenn die Durchschnittszahl 1,0 mg-Proz. $Ca^{\cdot\cdot}$ unseren Messungen zugrunde gelegt wird.

Den Vorteil unserer direkten Bestimmung erblicken wir aber nicht so sehr in der Möglichkeit, die bisher nur errechneten Werte experimentell zu bestätigen, als vielmehr darin, die Veränderung der Ca-Ionenwerte in einer physiologischen Flüssigkeit unter dem Einfluß besonders interessierender Faktoren, nämlich des Phosphats und Bicarbonats, direkt messen zu können.

Nach Feststellung der Ca-Ionisation mittels Oxalat wurde in einer anderen Portion des Liquors auf ganz gleiche Weise der Moment festgestellt, wo nach Hinzufügen steigender Mengen von Phosphat einerseits, Bicarbonat-CO_2-Gemisch andererseits die erste bleibende Trübung auftrat. Mit anderen Worten: es wurde ebenso wie für das Oxalat auch für das Phosphat und Bicarbonat die Löslichkeitsgrenze ihrer Verbindungen mit dem Liquorcalcium festgelegt und aus dem früheren oder späteren Auftreten unlöslicher Verbindungen ein Rückschluß auf die stärkere oder geringere Beeinflussung der Kalkionisation durch die betreffende hinzugefügte Substanz gezogen. Je größere Mengen dieser Substanz erforderlich sind, um einen Niederschlag zu bewirken, um so größer ist ihr Löslichkeitsprodukt mit dem Kalk, um so geringer ihre Rückwirkung auf die Dissoziation des Kalkes. Selbstredend darf in dem benutzten System nur eine Möglichkeit für das Entstehen der Trübung gegeben sein, um diese mit Sicherheit als Ca-Oxalat, Ca-Bicarbonat oder Ca-Phosphat ansprechen zu können. Die verwendeten Phosphat- und Bicarbonatlösungen waren genau analysiert und auf eine $[H^+]$ gebracht, die etwa derjenigen des Liquors in unseren Versuchen ($p_H = 7,7$) entsprach. Es empfahl sich, die Bicarbonatkonzentration von vornherein wesentlich größer als die des Phosphats zu wählen. Zu diesen Messungen stand uns Liquor eines Kindes mit starkem Hydrocephalus, bei dem häufige Punktionen ohnehin notwendig waren, in beliebiger Menge zur Verfügung. Derartige Versuche sind nachstehend aufgeführt.

Versuch 1 vom 11. April 1923.

Liquor unter Paraffin aufgefangen ($p_H = 7,7$). 3 ccm brauchen bis zur ersten Trübung 0,07 ccm m/100 Ammoniumoxalat, enthalten also 0,96 mg-Proz. Ca^{++}, einen normalen Wert.

a) 3 ccm Liquor + steigende Mengen einer m/6000 Natriumphosphatlösung von $p_H = 7{,}7$.

α.		β.		γ.	
Zugesetzte Phosphatmenge	Trübung	Zugesetzte Phosphatmenge	Trübung	Zugesetzte Phosphatmenge	Trübung
0,06 ccm	—	0,06 ccm	—	0,06 ccm	—
0,07 „	—	0,08 „	—	0,08 „	—
0,08 „	+—	0,09 „	+—	0,09 „	∓
0,09 „	+	0,1 „	+	0,1 „	++
0,1 „	++	0,11 „	++		
End-p_H =	7,75	End-p_H =	7,8	End-p_H =	7,8

Es ergibt sich also als Durchschnittswert aus den drei Parallelbestimmungen für die erste Trübung durch Phosphat 0,09 ccm.

b) 3 ccm Liquor + steigende Mengen einer 0,245 mol. Kohlensäure-bicarbonatlösung von $p_H = 7{,}65$.

α.		β.	
Zugefügte Bicarbonatmenge	Trübung	Zugefügte Bicarbonatmenge	Trübung
0,2 ccm	—	0,2 ccm	—
0,25 „	—	0,25 „	+—
0,3 „	+	0,3 „	++
0,35 „	++	0,35 „	+++
End-p_H =	7,7	End-p_H =	7,7

Als Durchschnittswert für die erste Trübung durch Bicarbonat ergibt sich 0,3 ccm.

Versuch 2 vom 16. April 1923.

Ganz die gleiche Versuchsanordnung.

1. In 3 ccm Liquor mit m/100 Ammoniumoxalat erste Trübung bei 0,08 ccm, End-$p_H = 7{,}7$.
2. In 3 ccm Liquor mit m/6000 Natriumphosphat bei 0,09 ccm: End-$p_H = 7{,}7$.
3. In 3 ccm Liquor mit 0,245 mol. Bicarbonatlösung bei 0,3 ccm: End-$p_H = 7{,}9$.

Versuch 3 vom 18. April 1923.

Gleiche Versuchsanordnung wie vorher.

1. Für 3 ccm Liquor werden verbraucht: 0,07 ccm m/100 Ammoniumoxalat.
2. Für 3 ccm Liquor werden verbraucht: 0,07 ccm m/6000 Phosphat.
3. Für 3 ccm Liquor werden verbraucht: 0,15 ccm 0,56 mol. Bicarbonat.

Versuch 4 vom 15. Mai 1923.

Gleiche Versuchsanordnung.

Für 3 ccm Liquor werden bis zum Auftreten der ersten Trübung verbraucht:

1. 0,06 ccm m/100 Ammoniumoxalat
2. 0,05 ccm m/6000 sekundäres Phosphat
3. 0,2 ccm 0,475 mol. Bicarbonat

} End-$p_H = 7{,}7$.

Aus diesen Versuchen ersieht man den gewaltigen Unterschied in den Löslichkeitsbedingungen der Phosphate und Carbonate des Calciums unter gleichzeitiger Feststellung des normalen Ca-Ionengehaltes im Liquor.

Bei Berechnung der absoluten Mengen an verbrauchten Ionen wird einmal mit ihrer praktisch völligen Dissoziation bei p_H 7,7 in den verwendeten Lösungen gerechnet, andererseits ist noch der von vornherein im Liquor vorhandene Anteil an Phosphat und Bicarbonat zu berücksichtigen. Wir fanden[1]) als Mittel 0,9 mg-Proz. P = 0,0028 g-Proz. HPO_4 in löslicher Form im Liquor bei Anwendung der kolorimetrischen Methode nach *Mariott-Haessler*. Die von *Embden*[2]) angegebene Bestimmung mit dem Strychnin-Molybdänreagens, für die Verhältnisse des Liquors etwas modifiziert, lieferte infolge der notwendigen Enteiweißung nach *Schenk* etwas höhere Werte für den säurelöslichen Phosphor, und zwar im Durchschnitt 0,004 g-Proz. HPO_4. Wir wollen 0,0035 g-Proz. HPO_4 als Mittel ansehen, das wären 0,36 Millimol im Liter[3]). Als durchschnittlichen Bicarbonatgehalt wollen wir den von *Brock* ermittelten Wert, nämlich 22 Millimol im Liter, unserer Rechnung zugrunde legen. Endlich ist die Dissoziationskonstante des Phosphats in zweiter Stufe in Rechnung zu stellen. Bei

$$p_H = 7{,}7 \text{ ist } \frac{\text{primäres Phosphat}}{\text{sekundäres Phosphat}} = \frac{1}{10},$$

wenn $k = 2 \cdot 10^{-7}$ angenommen wird[4]). Von den analytisch festgestellten Phosphatmengen des Liquors und der hinzugefügten Phosphatlösung sind also nur je $^9/_{10}$ als HPO_4'' in Rechnung zu stellen. Da die Bicarbonatmengen titrimetrisch ermittelt sind, so erübrigt sich hier eine entsprechende Korrektion.

Aus den vier Versuchen lassen sich auf dem geschilderten Wege folgende Mengen feststellen, die zur Erreichung des Löslichkeitsproduktes mit den im System vorhandenen Calciumionen erforderlich waren.

Tabelle III

(enthaltend die Resultate der Versuche 1 bis 4).

Versuchs-Nr.	Ca'' in Millimol pro Liter bei $p_H = 7{,}7$ mit Oxalat ermittelt	HPO_4'' in Millimol pro Liter bei $p_H = 7{,}7$			HCO_3' in Millimol pro Liter bei $p_H = 7{,}7$		
		präformiert	zugesetzt	Zusatz in Proz. der präform. Menge	präformiert	zugesetzt	Zusatz in Proz. der präform. Menge
1	0,24	0,324	0,161	50	22,0	24,5	111,4
2	0,20	0,324	0,161	50	22,0	24,5	111,4
3	0,24	0,324	0,126	38,9	22,0	27,9	126,8
4	0,28	0,324	0,090	28,4	22,0	31,6	143,6

[1]) Unveröffentlichte Versuche.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **113**, 138, 1921.

[3]) Inzwischen †, *von Gurwitsch* veröffentlichte Bestimmungen der Phosphatfraktionen im Liquor (Zeitschr. f. d. ges. exp. Med. **36**, 118, 1923) bestätigen unsere Zahlen.

[4]) *Michaelis*, Prakt. d. physik. Chem. 1921, S. 23.

Von besonderem Interesse ist bei diesen Zahlen das Prozentverhältnis der zur vorhandenen noch zuzusetzenden Menge an Anion, welche die Überschreitung des Löslichkeitsproduktes bedingt. Den Zahlen haftet eine Ungleichmäßigkeit dadurch an, daß als präformierte Anionenkonzentration Durchschnittswerte eingesetzt sind, während die zugesetzte Menge der Individualkonzentration des betreffenden Liquors entspricht. Für uns haben jedoch nur die Größenordnungen, in denen sich Phosphat- und Bicarbonatzusatz überhaupt bewegen, ein Interesse. Den Einwand, daß bei Bicarbonat Übersättigungserscheinungen eine Rolle gespielt hätten, können wir glatt zurückweisen, da eine solche Übersättigung sich sehr deutlich in den Versuchen durch die Art des Eintritts und des Verlaufs der Trübungen stets zu erkennen gab, soweit wir mit dieser Erscheinung zu kämpfen hatten. Wir haben zur weiteren Kontrolle Versuche mit Impfungen ausgeführt, die aber zu keinerlei Änderungen in unseren Resultaten führten.

Es ergibt sich also die Tatsache, daß zur Erreichung des Löslichkeitsproduktes mit Ca^{++} im Liquor die Bicarbonatmenge auf etwa das $2^1/_4$fache erhöht werden muß, die Phosphatmenge aber nur um 30 bis 50 Proz. Damit ist ein Experimentalbeweis für die größere Bedeutung der Phosphate gegenüber dem Bicarbonat bezüglich der Ionisation des Calciums in physiologischen Lösungen erbracht.

Zusammenfassung.

1. Die Ca-Ionenkonzentration des kindlichen Liquor cerebrospinalis wird mittels der Methode von *Brinkman* und *van Dam* direkt gemessen.

2. Bei einer durchschnittlichen Acidität von $p_H = 7{,}6$ bis $7{,}7$ sind von der Gesamt-Ca-Menge, die im Mittel 5 mg-Proz. beträgt, 20 Proz. ionisiert = 1 mg-Proz. Ca-Ionen.

3. In corpore dürfte die $Ca^{\cdot\cdot}$-Menge infolge der etwas höheren Acidität größer sein und den errechneten Werten *Brocks* nahekommen.

4. Durch Bicarbonat und sekundäres Phosphat wird eine starke Verminderung des Ca-Dissoziation bewirkt.

5. Der entionisierende Einfluß des HPO_4-Ions ist unter den geprüften Bedingungen mehr als doppelt so stark wie der des Bicarbonations.

Über Kolloidkapillaren.

Ein Beitrag zur Modelluntersuchungsmethode biologischer Erscheinungen.

Von

Michael J. Breitmann.

(Aus dem Laboratorium der somatischen Abteilung des Petrograder pädologischen Instituts.)

(Eingegangen am 28. Oktober 1923.)

Im Jahre 1920 haben der leider zu früh verstorbene Prof. *N. A. Beloff* und ich eine neue Methode der Anwendung der Kolloidkapillare zum Studium vieler Fragen der Kolloidchemie, der Pharmakologie usw., speziell der Einwirkung verschiedener Stoffe auf die Gefäße, ausgearbeitet. Die Gedanken von *N. A. Beloff* und die Resultate der unter seiner Leitung von *M. Mandelstamm* ausgeführten Arbeit findet man in dieser Zeitschr. **140**, Heft 4/6, S. 544—554, 1923. Mich persönlich interessierte die Idee von *freien Kapillaren*. Dazu bereite ich Gelatinekapillaren *mit einer Membran*, die mittels Formalinieren oder Chromieren der Außenschicht oder mittels Einschließen der Kapillare in ein dünnes Gummiröhrchen bereitet werden. Bis diese Arbeit fertig sein wird, werde ich jetzt über die Resultate der Benutzung nicht freier Gelatinekapillaren, d. h. solcher, die in eine Glasröhre eingeschlossen sind, berichten. *N. A. Beloff* sowie *M. Mandelstamm* benutzen einen Glastrichter; das untere Ende des schmalen Teiles wird durch einen einfachen Kork verschlossen, durch den eine gut geschliffene dicke Nadel gestochen wird. Damit die Nadel möglichst genau die Mitte des Röhrchens einnimmt, stellt man den Kork mit der durchgezogenen Nadel auf den Boden eines Glases und drückt auf ihn vorsichtig das Röhrchen herauf, bis die gewünschte Stellung erreicht wird. Aber auch auf solche Weise ist es schwer, eine genaue Zentrierung zu erreichen; dabei wird auch die Gelatine beim Hineindrücken der Nadel traumatisiert, sowie beim Herausziehen die Glattheit der Kapillarwände zerstört und dadurch die Resultate des Versuchs diskreditiert. Daher benutzte ich anstatt des Glastrichters *ein Produkt-Butyrometer*

für Rahm System *Gerber*, mit dem oberen Ende nach unten gekehrt (man kann spezielle Apparate konstruieren, aber wir benutzen das, was wir haben). Das Butyrometer hat zwei Teile: einen engen, 7,5 cm lang und 11 mm im Durchmesser (die äußere Oberfläche ist in 100 Teile geteilt, was sehr bequem für die Berechnung der Höhe des Kapillarröhrchens ist), und einen weiten, etwa 10 cm lang und 22 mm breit. Beide Öffnungen des Butyrometers, die obere und die untere, werden mit im Zentrum durchlöchertem Gummikork verschlossen, was sehr bequem für die genaue Zentrierung der Nadel, die in die noch nicht erstarrte Gelatine eingeführt wird, ist. Um beim Ausziehen der Nadel die Gelatine nicht zu traumatisieren, erwärmt man das aus dem unteren Kork hervorragende Nadelende, indem man das Butyrometer wagerecht hält. Nachdem die Nadel und beide Korke entfernt sind, befestigt man das Butyrometer in senkrechter Haltung und läßt aus einem höher stehenden Gefäße die zu untersuchende Flüssigkeit durchfließen, indem man deren Strom in gewöhnlicher Weise reguliert. Über Resultate diesbezüglicher spezieller Untersuchungen werde ich demnächst berichten, jetzt aber erwähne ich nur, daß die Benutzung der Kolloidkapillare nach der *Beloff*schen und meiner Methode den Sinn der Arbeiten der Schule von Prof. *N. P. Krawkoff* erklärt, da man sieht, welche Erscheinungen von dem neuro-muskulären Apparat der Gefäße und welche schon von ihren kolloidalen Eigenschaften abhängen.

Eine neue Methode der Bewertung der Geschwindigkeit und der Tiefe der Diffusion in Gallerten.

Von

Michael J. Breitmann und N. N. Kusnetzoff.

(Aus dem Kabinett der physikalischen Chemie des chemischen Laboratoriums des Petrograder technologischen Instituts und aus dem Laboratorium der somatischen Abteilung des Petrograder pädologischen Instituts.)

(Eingegangen am 28. Oktober 1923.)

Die Bestimmung der Geschwindigkeit und der Tiefe der Diffusion in Gallerten hat eine große Bedeutung für das Studium einer großen Reihe biologischer Erscheinungen: der Absorption, Imbibition, Infiltration, darunter mit pathologischen Ablagerungen: Salzen, Pigmenten, Lipoiden, besonders mit Cholesterin, der vitalen Färbung usw. Soviel uns bekannt, haben wir zuerst zu diesem Zwecke *das mikrometrische Kathetometer* oder *den Komparator*, System *Lucas* (Patent U. K. Nr. 13242, 1908) der Firma The Cambridge Scientific Instrument Co. benutzt. Dieser Apparat wird in denjenigen technischen Laboratorien gebraucht, wo genaue lineare Messungen nötig sind. Diesen Apparat, welcher auch „microscope de lecture“ genannt wird, kann man senkrecht, wagerecht oder in einer geneigten Stellung anwenden. Der Tubus, woran das Mikroskop fixiert ist, kann langsam mittels einer Schraube und eines Schraubenkopfes auf einer Distanz von 40 mm verschoben werden. Die Genauigkeit der mikrometrischen Abzählungen ist 0,01 mm. Das zu untersuchende Objekt wird auf ein gleitendes Tischchen gelegt und dessen Lage genau zentriert. Die Bewegung des Mikroskops ist viel gleichmäßiger, als wenn man eine Cremaillère anwendet. Das Mikroskop ist mit einem Netze aus gekreuzten Fäden versehen, sowie mit einem Achromatobjektiv von Zeiss a_2 und einem Okular Nr. 2.

Die zu untersuchende Gallerte, pathologisch-anatomisches Präparat, explantiertes Gewebe nach *Carrel* usw., wird in kleine Glasröhrchen gebracht, die unten verschmolzen oder mit einem Kork verschlossen sind. Auf der äußeren Wand des Röhrchens macht man mittels einer

Feile und einer Farbe eine „Notiz" oder einen „Leuchtturm", von wo ab dann alle weitere Abzählungen geführt werden. In den oberen Teil des senkrecht befestigten Röhrchens führt man diejenige Lösung, Farbe usw. hinein, deren Diffusionsgeschwindigkeit und -tiefe man studieren will, und bestimmt die Tiefe des Eindringens genannter Substanzen in bestimmten Zeiträumen. Indem man den Durchmesser des Rohres, die Konzentration der Gallerte und der untersuchten Flüssigkeit, des umgebenden Milieus usw. ändert, kann man nach Belieben die Bedingungen des Experimentes variieren. Da man einen hundertsten Teil des Millimeters abzählen kann, so ist der Apparat besonders bequem für mikrochemische Reaktionen.

Zur Frage über die Ring- und Schichtungsbildung bei der Diffusion in Gallerten.

Von

Michael J. Breitmann und **N. P. Marasujeff.**

(Aus dem städtischen hygienischen Laboratorium und aus dem Laboratorium der somatischen Abteilung des Petrograder pädologischen Instituts.)

(Eingegangen am 28. Oktober 1923.)

Bei unserer Nachprüfung einiger Versuche von *R. E. Liesegang*, speziell mit $AgNO_3$ und Alkalichromaten, waren die Resultate beim Versuch XCIII[1]) am augenscheinlichsten und haben prinzipielle Unterschiede aufgewiesen.

Im *Liesegang*schen Versuch XCIII war eine 9×12-cm-Glasplatte bedeckt mit einer Mischung von 5 ccm 10proz. Gelatine, 1 ccm 10proz. Gelatose, 1 Tropfen 2,5proz. Citronensäurelösung und 4 ccm Wasser. Nach dem Erstarren wurde auf die Mitte 1 Tropfen 25proz. $AgNO_3$-Lösung aufgesetzt. In Abständen von einigen Zentimetern kamen links und rechts davon Tropfen vom 5proz. Kaliummonochromat und 10proz. Ammoniumbichromat. Wir haben Gelatine ohne Gelatose und Citronensäure und anstatt Kaliummonochromat Kaliumbichromat genommen. Wie *Liesegang*, so haben wir auch im Schnittpunkt der Diffusionskreise von $AgNO_3$ und des Chromats in einer Gelatinegallertschicht eigenartige „Vignetten" beobachtet: die beiden Diffusionskreise verbreiten sich aber ziemlich selbständig, was von *Liesegang* nicht scharf genug betont wird. Die Ringe des reduzierten Silbers verbreiten sich wegen seines größeren spezifischen Gewichtes mehr in die Tiefe, wo es einer chemischen Reaktion mit Chromat entgeht und die dem Glase nächste Schicht bildet. Solche reine Silberringe kann man auch ohne Chromzusatz in einem Kapillarrohre erhalten, wo sie

---

[1]) *R. E. Liesegang*, Spezielle Methoden der Diffusion in Gallerten. Handb. d. biol. Arbeitsmeth. von Prof. *E. Abderhalden*, III. 1, 110.

ein dem quergestreiften Muskel ähnliches Bild darstellen[1]). In der obersten Schicht aber werden Silberchromatkombinationen gebildet, die unter dem Mikroskop oberflächlich, höher als Silberringe liegen. Gerade hier sieht man die genannten „Vignetten“, die wie Tulpenknollen aussehen; die Grenze zwischen beiden Diffusionskreisen ist wie gewöhnlich eine gerade Linie. In dem Falle, wo man *nur* $AgNO_3$ benutzt, findet *Ostwalds* Übersättigungstheorie keine Anwendung. Es ist möglich, daß die etwaigen Gelatineverunreinigungen bei der Bildung der Ringe des reduzierten Silbers eine dem Chromat ähnliche Rolle spielen. Vielleicht wird jemand eine bessere Erklärung geben, die Tatsache aber besteht und verdient nachgeprüft zu werden.

In einem Präparat, das 2 bis 3 Tage alt ist, haben wir unter dem Mikroskop verschiedene Stellen beobachtet, die einerseits ganz *einem Schnitte der Koralle,* wie er in *Hertwigs* Zoologie abgebildet ist, photographisch ähnlich sind, an anderen Stellen aber die Verteilung *der Gehirnfurchen der ersten, zweiten und dritten Ordnung* im kleinen Maßstabe wiedergegeben[1]). „Ähnlichkeit ist kein Beweis“, diese Bilder sind nur Marionetten, die lediglich eine äußere Analogie mit Lebenserscheinungen haben, aber, wie *Liesegang* auch betont, „für Vergleiche mit der Formenbildung in Lebewesen von Interesse sind, denn wahrscheinlich wird man auch dort allmählich immer mehr nach den Beziehungen der Form zum Chemischen suchen“.

---

[1]) Diese Präparate haben wir im hiesigen Gelehrtenhaus (Dom Utschonych) am 3. Juli 1922 demonstriert.

Einfache Methode zur direkten Bestimmung der Wasserstoffzahl des Blutes mittels Indikatoren.

Von

J. Holló und St. Weiss.

(Aus der I. med. Klinik der kgl. Pázmány Péter-Universität in Budapest.)

(Eingegangen am 30. Oktober 1923.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

I. Kritische Übersicht über die bisherigen Methoden.

Wir haben bisher noch keine einfache und dabei auch zu wissenschaftlichen Zwecken brauchbare, genaue klinische Methode zur Bestimmung der Wasserstoffzahl im Blute.

Die elektrometrische Bestimmung erfordert eine komplizierte Apparatur und hat dabei nicht gerade den Vorzug einer besonderen Empfindlichkeit. Außerdem ist sie — speziell aber in kohlensäurehaltigen Lösungen — eine sehr heikle Methode, die auch in der Hand von verläßlichsten Autoren zu widersprechenden Angaben führen kann. Wir möchten zu diesem Punkte nur eine Arbeit von *Evans* (1) erwähnen (On a probable error in determinations by means of the hydrogen elektrode), der gefunden hat, daß die elektrometrische Methode bei Lösungen, welche CO_2 enthalten, wegen katalytischer Bildung von Ameisensäure an der Platinelektrode um etwa 60 Proz. zu hohe (zu saure) Resultate gibt — und dazu eine Nachprüfung dieser wichtigen Angabe durch *Cullen* und *Baird* (2), die ihrerseits gefunden haben, daß *Evans's* Konklusionen auf methodischen Fehlern beruhen. Jedenfalls liegen bisher nur ganz vereinzelte, meistens nicht von Klinikern ausgeführte elektrometrische Wasserstoffzahlbestimmungen im menschlichen Blute vor.

Die Methode von *Hasselbalch* (3) (gasanalytisches Verfahren), die *Höber* (4) „einfacher und zugleich exakter" nennt, und welche zu klinischen Zwecken besonders von *H. Straub* und seiner Schule benutzt wird, gibt zwar empfindlichere Ausschläge, ist aber, was die Einfachheit betrifft, noch immer nicht das, was wir eine *klinische* Methode nennen; außerdem hat sie einige diskutable Punkte, auf die wir etwas näher eingehen müssen. Die *Hasselbalch*sche Methode beruht bekanntlich auf einer rechnerischen Ermittlung der Wasserstoffzahl aus dem Verhältnis der in Form einerseits von HCO_3-Ionen — sogenannte gebundene oder Bicarbonatkohlensäure —, andererseits aber in Form von H_2CO_3-Molekülen vorhandenen — sogenannten freien — Kohlensäure. Die Gesamtkohlensäure (gebundene + freie Kohlensäure) wird nach Saturation des Blutes mit einer Atmo-

sphäre von bestimmtem CO_2-Druck durch Evakuation bestimmt[1]); die freie Kohlensäure aber aus dem CO_2-Druck der mit dem Blute in Gleichgewicht gebrachten Atmosphäre mittels des *Bohr*schen (5) Absorptionskoeffizienten berechnet. Zur Bestimmung wird entweder der konstante Kohlensäuredruck von 40 mm gewählt und die so erhaltene Wasserstoffzahl *reduzierte* Wasserstoffzahl genannt, oder aber der zu diesem Zwecke nach *Haldane* und *Pristley* (6) bestimmte alveolare CO_2-Druck: *regulierte* Wasserstoffzahl.

Was zunächst die *reduzierte Wasserstoffzahl* betrifft, so ist es vielleicht nicht überflüssig zu sagen, daß es ganz irrtümlich wäre, diese Größe als Maß der wirklichen aktuellen Reaktion des Blutes zu betrachten. Die aktuelle Reaktion des Blutes wird, wie schon gesagt, durch das Verhältnis zweier *unabhängiger* Variablen, nämlich seinen Bicarbonatgehalt und seinen Gehalt an freier Kohlensäure (Kohlensäuredruck) determiniert. Der Gehalt des Blutes an Bicarbonat bei einem *gewählten konstanten CO_2-Druck — die Formel der reduzierten Wasserstoffzahl enthält neben Konstanten ausschließlich diese Variable* — ist zwar von großer Wichtigkeit zur Kenntnis des Puffersystems des Blutes und hat eine besondere Bedeutung zur Beurteilung gewisser Stoffwechselstörungen, sagt aber — da die CO_2-Spannung des Blutes in Wirklichkeit nicht konstant ist, sondern unter verschiedenen Verhältnissen große Variationen zeigt — nichts über die wirkliche Wasserstoffzahl des Blutes aus. Sie ist also zur Erforschung der speziell mit der aktuellen Reaktion des Blutes zusammenhängenden Probleme (Atmungsregulation usw.) ganz unzureichend. Sollte die reduzierte Wasserstoffzahl trotzdem als Maß der Blutreaktion benutzt werden, so könnte das nur unter der stillschweigenden Voraussetzung geschehen, daß erstens bei Verschiebungen der Blutreaktion immer Stoffwechselstörungen die primären und die Änderungen der CO_2-Spannung die sekundären, also durch die Regulation des Organismus bedingten wären, zweitens aber, daß diese Regulation entweder eine praktisch vollkommene oder aber bei allen Gesunden und Kranken die gleiche, zumindest eine vergleichbare wäre. Diese Voraussetzungen treffen aber nicht zu.

Das Blut kann z. B. bei künstlicher Hypernoë oder Apnoë alkalisch oder sauer werden, ohne jede Änderung der reduzierten Wasserstoffzahl. Die Unterschiede in der alveolaren CO_2-Spannung selbst gesunder Menschen sind kaum geringer als die Unterschiede der Alkalireserven, ohne daß bisher eine feste Beziehung dieser beiden Größen zueinander nachgewiesen wäre; die Wasserstoffzahl des Blutes zeigt nämlich auch bei verschiedenen normalen Menschen Unterschiede bis zu 30 Proz., und diese Unterschiede können in pathologischen Fällen weit über 100 Proz. betragen [elektrometrische Messungen von *Michaelis* und *Davidoff* (7)]. Die ziemlich verbreitete irrtümliche Anschauung über die peinliche Konstanz der Wasserstoffzahl des Blutes hat ihren Ursprung wahrscheinlich dem Umstand zu verdanken, daß man Wasserstoffzahlen gewöhnlich in logarithmischer Form, als p_H, anzugeben pflegt.

Was aber die Benutzung der *regulierten Wasserstoffzahl* als Maß der aktuellen Reaktion des Blutes betrifft, so muß zuerst hervorgehoben werden, daß die Bestimmung der regulierten Wasserstoffzahl nur auf Grund einer gleichzeitigen Bestimmung der alveolaren CO_2-Spannung möglich ist, wo-

[1]) *Straub* bestimmt die gebundene Kohlensäure zu klinischen Zwecken mit dem kleinen Differenzierapparat von *Barcroft*.

durch diese ganze Messung nicht nur komplizierter, sondern in ihrer Brauchbarkeit und Verläßlichkeit bedeutend eingeschränkt wird. So ist die Bestimmung der alveolaren CO_2-Spannung bei benommenen, aber auch bei unintelligenten Kranken überhaupt unmöglich und liefert bei stärker dyspnoischen Kranken wegen ungleicher Luftmischung in der Lunge nur ungenaue Werte [*Siebeck* (8)].

Aber selbst eine anstandslose Bestimmung der alveolaren CO_2-Spannung vorausgesetzt, müssen gegen die Identifizierung der regulierten Wasserstoffzahl mit der aktuellen Reaktion des Blutes Bedenken erhoben werden. Wir wollen uns zuerst erinnern, daß bei der *Hasselbalch*schen Methode (und auch bei den *Straub*schen Untersuchungen) zwar mit venösem Blute gearbeitet wird, als Maß der Kohlensäurespannung aber trotzdem die nach *Haldane* und *Pristley* bestimmte, also offene, arterielle, alveolare CO_2-Spannung benutzt wird, offenbar aus wahrscheinlich nicht ganz begründeter [s. *Kauders* und *Porges* (9)] Scheu vor der *Plesch*schen Methode zur Bestimmung der venösen CO_2-Spannung. Die aus dem Bicarbonatgehalt des venösen und aus dem freien Kohlensäuregehalt des arteriellen Blutes berechnete Wasserstoffzahl kann aber natürlich nur für jene Fälle einen exakten Wert ergeben, in denen die Bindungsvermögen des venösen und des arteriellen Blutes sich gleich sind; dann kann die regulierte Wasserstoffzahl die aktuelle Reaktion des arteriellen Blutes ergeben. Diese Voraussetzung trifft aber nicht streng zu; wir wissen schon seit *Pflüger*, daß in den Lungen Oxydationsprozesse verlaufen; *Eppinger* und *Schiller* (10) haben nun in neueren Untersuchungen gezeigt, daß die Lunge die Fähigkeit hat, Milchsäure zu verbrennen, und so konnten diese Forscher sowohl in Tierversuchen wie in Untersuchungen an Menschen, speziell aber in pathologischen Fällen, Unterschiede bis zu 15 Proz. im Bindungsvermögen des venösen und des arteriellen Blutes nachweisen. Bei exakten wissenschaftlichen Untersuchungen über die Wasserstoffzahl des Blutes muß also entweder arterielles Blut benutzt werden, was allerdings eine Komplikation der Untersuchungen bedeutet, oder aber man muß die Bestimmungen der alveolaren CO_2-Spannung mit der Methode von *Plesch* ausführen.

Schwieriger sind jene Bedenken zu beheben, die sich auf die Identifikation der in der alveolaren Luft gemessenen CO_2-Spannung mit der CO_2-Spannung im Blute überhaupt beziehen. Wir möchten dazu nur an die noch unentschiedene Frage der aktiven Gassekretion des Lungenparenchyms erinnern. Für pathologische Fälle ist diese Identität gewiß nicht bewiesen; denn *Peters*, *Barr* und *Rule* (11) fanden ganz im Gegenteil bei Untersuchungen an Kranken mit kardialer Dyspnoe Unterschiede bis zu 19 mm Hg (etwa 40 Proz.!) zwischen der nach *Haldane* und *Pristley* gemessenen und der im arteriellen Blute direkt bestimmten CO_2-Spannung.

Wir sehen also, daß die biologischen Vorbedingungen der *Hasselbalch*schen (und *Straub*schen) Bestimmung der aktuellen Blutreaktion nicht immer streng zutreffen, und daß dadurch nicht ganz zu vernachlässigende Fehler entstehen können. Neben der biologischen muß aber auch die physikalisch-chemische Seite der *Hasselbalch*schen Berechnung revidiert werden [s. dazu *Parsons* (12), *Peters*, *Barr* und *Rule* (11), sowie *Evans* (13); die Arbeiten von *Parsons* sind uns leider nur aus Berichten bekannt].

Die *Hasselbalch*sche Grundgleichung lautet folgendermaßen:

$$p_H = p_{K1} + \log \frac{[\text{Bicarbonat}]}{[CO_2]}$$

was nichts anderes ist, als die Anwendung des Massenwirkungsgesetzes auf Lösungen von Kohlensäure und Bicarbonat. Die Konstante K ist dazu von *Hasselbalch* aus elektrometrischen Messungen der p_H in reinen Lösungen von bekanntem Bicarbonat- und CO_2-Gehalt berechnet worden; da diese Konstante mit dem Bicarbonatgehalt der Lösung etwas variiert – früher wurde angenommen: infolge der von der Konzentration abhängigen Dissoziation des Bicarbonats; seit *Bjerrums* Untersuchungen sagen wir aber: wegen des Einflusses der Salzkonzentration auf die *Aktivität* der H-Ionen —, so wurde dieselbe von *Hasselbalch* für alle im Blute in Betracht kommenden Konzentrationen extra bestimmt. Für die Berechnung der p_H muß dann immer jene Konstante ausgewählt werden, die dem vorher bestimmten Bicarbonatgehalt des Blutes entspricht.

Bei diesem Gedankengang hat *Hasselbalch* den seinerzeit sehr natürlichen Fehler begangen, daß er den Einfluß der im Blute neben dem Bicarbonat in überwiegender Menge vorhandenen Neutralsalze auf die Dissoziation des Bicarbonats, oder, richtiger gesagt, auf die Aktivität der $H^{\cdot}$-Ionen vernachlässigt hat. Über diesen Einfluß läßt sich aber heute weder *theoretisch* (s. *Michaelis*, Die Wasserstoffionenkonzentration, 2. Aufl., S. 93) (14), noch *praktisch* streiten; *Michaelis* und *Rona* (15) fanden, daß eine Bicarbonat-Kohlensäurelösung durch Zugabe von Natriumchlorid in physiologischer Konzentration saurer wird, und schlossen daraus, daß „der Dissoziationsgrad des Natriumbicarbonats im Blute nur 0,6 beträgt". Dasselbe fand auch *Milroy* (16). *Parsons* (12) sowie *Evans* (13) fanden dann, daß das Serum, hauptsächlich infolge seines Kochsalzgehaltes, um rund p_H 0,3 (100 Proz.!) saurer ist, als eine entsprechende Bicarbonatlösung bei gleichem Kohlensäuredruck. Die *Hasselbalch*schen Konstanten aus Bicarbonatlösungen werden also für Blut zu hoch sein, und die *Hasselbalch*sche Berechnung der Blut-p_H zu hohe (zu alkalische) Werte ergeben.

Es ist also nicht ganz klar, wieso *Hasselbalch* bei Blut-p_H-Bestimmungen trotzdem gute (bis auf p_H 0,04) Übereinstimmungen mit den elektrometrischen Kontrollen erzielen konnte. Wir müssen annehmen, daß der eine Fehler durch andere Fehler, die wahrscheinlich nicht für alle Fälle dieselben sind, paralysiert wird, was aber kaum zur Verläßlichkeit der Methode beiträgt. Übrigens hat *Parsons* (12) beim Vergleich der gasanalytischen mit der elektrometrischen Methode im Blute Abweichungen bis zu p_H 0,09 (etwa 20 Proz.) gefunden. Wir werden auf die verschiedenen Fehlermöglichkeiten noch unten zurückkommen.

Jedenfalls muß die *Hasselbalch*sche Konstante aus elektrometrischen (oder kolorimetrischen) p_H-Bestimmungen *in normalem Menschenblute* neu ermittelt werden; diese neue Konstante wird natürlich unabhängig sein vom Bicarbonatgehalt des Blutes und nur vom Gesamtsalzgehalt abhängen. Diese beiden Größen sind aber unabhängig voneinander. Wenn also *Hasselbalch* trotzdem, und zwar je nach dem Bicarbonatgehalt des Blutes[1]), mit verschiedenen Konstanten arbeitet, die untereinander, entsprechend den in Betracht kommenden Bicarbonatwerten, zwischen $p_K = 6{,}35$ und 6,45 variieren, so können dadurch unter Umständen Fehler von bis $p_H = 0{,}1$ (25 Proz.) entstehen. In pathologischen Fällen ist natürlich auch der Gesamtsalzgehalt des Serums und somit die entsprechende reduzierte Dissoziationskonstante der Kohlensäure nicht ganz konstant. Die Leit-

---

[1]) *Straub* und *Meier* fanden bei Nierenkranken Werte von 12 bis 76 Vol.-Proz. CO_2.

fähigkeit (λ 25) des Serums schwankt unter pathologischen Bedingungen zwischen 98 und 142 [*Viola*, zitiert nach *Schade* (17)]. Wir können also ungefähr annehmen, daß der Salzgehalt des Serums zwischen 0,135 n und 0,185 n schwankt (physiologischer Salzgehalt = 0,155 n). Leider sind unseres Wissens bisher keine Messungen über den Einfluß von Neutralsalzen auf die reduzierte Dissoziationskonstante der Kohlensäure vorhanden. Wenn wir uns aber zur Orientierung an die sonst so ähnlichen Verhältnisse der Phosphatgemische halten, so können wir aus einer Tabelle von *Michaelis* und *Krüger* (18) die Schwankungen der reduzierten Dissoziationskonstante der Kohlensäure, infolge von verschiedenem Salzgehalt von pathologischen Sera, auf $p_H \pm 0{,}025$ schätzen, das ist eine Größe, die innerhalb der Genauigkeit selbst der elektrometrischen Messung liegt. Der Fehler also, der dadurch zustande kommt, daß man mit einer von pathologischen Variationen des Gesamtsalzgehaltes unabhängigen Konstante rechnet, kommt praktisch kaum in Betracht. Derselbe Fehler kommt übrigens bei allen p_H-Bestimmungsmethoden vor, die mit einer Verdünnung des Blutes arbeiten.

Eine weitere Vernachlässigung der *Hasselbalch*schen Methode ist, daß sie mit einem konstanten Absorptionskoeffizienten der Kohlensäure rechnet. Es ist aber leicht einzusehen, daß derselbe unter anderem auch vom Trockensubstanzgehalt des Blutes abhängen muß, welche Größe, speziell bei Anämien und Hyperglobulien, sehr weitgehende Änderungen zeigen kann. Die Schwankungen des Absorptionskoeffizienten werden trotzdem nicht bedeutend sein. Der Absorptionskoeffizient von Serum und Blut differiert nur um 6 Proz. voneinander, trotzdem das Blut um rund 100 Proz. mehr Trockensubstanz als das Serum hat. Die Vernachlässigung der möglichen Variationen des Absorptionskoeffizienten wird also selbst in pathologischen Fällen kaum Fehler über 5 bis 6 Proz. verursachen.

Über den Einfluß der Oxygenisation des Blutes während dessen Saturation mit der kohlensäurehaltigen Atmosphäre siehe später bei Beschreibung der eigenen Methode.

Was schließlich den Einwand von *Parsons* (13) betrifft, daß das Blut kein homogenes System ist, so hat dieser Einwand nur dann seine Berechtigung, wenn wir annehmen, daß Blutkörperchen und Plasma im Blute nicht dieselbe p_H haben. So etwas ist auf Grund z. B. des *Donnan*schen Gleichgewichtes, wahrscheinlich aber nur in beschränktem Maße, möglich; unseres Wissens liegen aber bisher keine Untersuchungen in dieser Richtung vor. Zur Entscheidung dieser Frage müßte jedenfalls untersucht werden, wieweit das aus p_H-Bestimmungen und aus der im *Serum* ermittelten reduzierten Dissoziationskonstante der Kohlensäure für das *Gesamtblut* berechnete Verhältnis $\frac{[HCO_3]}{[CO_2]}$ mit direkten Bestimmungen übereinstimmt.

Alles in allem sind wir also nicht in der Lage, die *Hasselbalch*sche Methode, selbst mit korrigierten Konstanten, als eine besonders genaue oder verläßliche Methode anzuerkennen. Speziell müssen die in pathologischen Fällen berechneten Werte der regulierten Wasserstoffzahl mit großer Vorsicht angenommen werden.

Zu den gasanalytischen Methoden zur Bestimmung der p_H des Blutes gehört ferner die wenig gebrauchte Methode von *Barcroft* und *Peters*. Sie beruht auf der Voraussetzung, daß einer bestimmten Größe der Oxygenbindungskonstante der *Hill*schen Gleichung im Blute eine gegebene aktuelle Reaktion entspricht. *Hasselbalch* (19) hat jedoch gezeigt, daß diese Voraus-

setzung, speziell in pathologischen Fällen, nicht zutrifft — wahrscheinlich weil die O_2-Bindungskonstante noch von anderen Faktoren (Elektrolyte?) mitbestimmt wird. Auch sonst wäre aber die *Barcroft-Peters*sche Methode keine einfache klinische Methode.

Schließlich wäre die *Haggard* und *Henderson*sche (20) Methode zu erwähnen. (An Menschen bisher unseres Wissens nur von *Means, Bock* und *Woodwill* (21), und von *Peters, Barr* und *Rule* (11) angewendet.) Diese Autoren berechnen die p_H aus der Kohlensäurebindungskurve und aus der im Blute direkt nach *van Slyke* bestimmten Gesamtkohlensäure. Da im Blute die freie Kohlensäure, mit der bei gleichbleibender Bicarbonatkonzentration die p_H umgekehrt proportional ist, nur etwa ein Zehntel der Gesamtkohlensäure ausmacht, so können dadurch die Fehler der Bestimmungen bei der Berechnung der p_H verzehnfacht werden. *Straub* und *Meier* (22) haben sich folgendermaßen über diese Methode geäußert: „Steigt die Kohlensäurebindungskurve in dem kritischen Spannungsbezirk steil auf, so kann man mit diesem Verfahren den Punkt, der das physikalisch-chemische Verhalten des Arterienblutes bestimmt, sehr genau ermitteln. Sobald aber die Kurve flacher verläuft, bedeutet ein geringer Fehler in der Bestimmung des Kohlensäuregehaltes einen großen Fehler in der Kohlensäurespannung. Darum ist die Methode für Untersuchungen an Menschen nicht ausreichend genau."

Es scheint, daß man bei der Bestimmung der aktuellen Reaktion des Blutes, selbst bei Gebrauch von komplizierten Methoden, nicht über einen gewissen Grad von Genauigkeit und Verläßlichkeit hinauskommen kann, und dieser Umstand berechtigt die neueren Bestrebungen zur Einführung der bedeutend einfacheren kolorimetrischen p_H-Bestimmungen mittels Indikatoren im Blute.

Eine p_H-Bestimmung mittels Indikatoren im Blute hat folgende Schwierigkeiten zu berücksichtigen: den Salzfehler, den Fehler, den die Eigenfarbe des Plasmas bedingen könnte, und schließlich und hauptsächlich den Eiweißfehler, welch letzterer um so mehr in Betracht kommt, als die beiden im p_H-Bereich des Blutes brauchbaren Indikatoren, Phenolrot und noch mehr Neutralrot, sehr eiweißempfindlich sind. (Der von *Michaelis* und *Gyémánt* (23) angegebene, an sich ausgezeichnete Indikator m-Nitrophenol, der gegen Eiweiß praktisch unempfindlich ist, ist wegen seiner geringen Färbekraft und also großem „Säurefehler" (s. später) zu unseren Zwecken leider *nicht brauchbar.*)

Der Salzfehler kommt praktisch nur wenig in Betracht, da der Salzgehalt der *Sörensen*schen Phosphatröhren ungefähr dem Salzgehalt des Plasmas entspricht; es handelt sich also hauptsächlich um die Ausschaltung der beiden letzten Fehler. Als erster Ausweg vor diesen Schwierigkeiten wurde — in brauchbarer Form zuerst von *Dale* und *Evans* (24) — die Dialyse des Blutes gegenüber physiologischer NaCl-Lösung mit darauffolgender Bestimmung der p_H im farblosen und eiweißfreien Dialysat empfohlen. Dieser Methode, wie übrigens allen kolorimetrischen p_H-Bestimmungen im Blute, liegt als erste Vorbedingung die theoretisch wie praktisch [s. *Michaelis* und *Davidoff* (7)] gesicherte Tatsache zugrunde, daß sich die Reaktion des Blutes durch Verdünnung mit kohlensäurefreier

und dem Blute in seiner Wirkung auf die „Aktivität" der Wasserstoffionen gleichwertigen (gleichkonzentrierten) Salzlösung nicht ändert. Die Dialyse ist jedoch keine sehr einfache Methode und hat dabei verschiedene schwache Punkte. Wird zu kurze Zeit dialysiert — *Dale* und *Evans* geben 10 bis 15 Minuten an —, so wird das Dialysat, angenommen selbst, daß es zu einem Ausgleich der am schnellsten wandernden H-Ionen kommt, jedenfalls eine sehr pufferarme Lösung werden, in welcher p_H-Messungen überhaupt und speziell eine kolorimetrische p_H-Messung mit großen Ungenauigkeiten verbunden ist (z. B. wegen des Einflusses des Indikators selbst auf die Reaktion).

Es muß also längere Zeit dialysiert werden und um so mehr, als die Durchlässigkeit der verwendeten Kollodiumhülsen nicht unverändert bleibt und so nicht für jeden Fall genau vorauszusehen ist; während dieser längeren Zeit muß sehr genau auf jeden Verlust von Kohlensäure aus dem damit stark übersättigten Blute geachtet werden, was nicht leicht zu verhüten ist und eine sehr präzise Apparatur erfordert.

Es ist außerdem zweifelhaft, ob selbst die richtig ausgeführte Dialyse ganz richtige Werte liefern kann; bekanntlich entsteht bei der Dialyse von Lösungen, welche auch undialysierbare Ionen enthalten, eine Potentialdifferenz zwischen Innen- und Außenseite der Membran, welche dem Konzentrationsausgleich der dialysierbaren Ionen entgegentritt (*Donnaneffekt*). Der *Donnaneffekt*, der in salzfreien Lösungen zu bedeutenden Verschiebungen führen kann, wird zwar durch die gleichzeitige Anwesenheit von Salzen sehr stark reduziert, doch glauben wir, daß er bei dem hohen Eiweißgehalt des Serums trotzdem nicht ohne weiteres vernachlässigt werden kann. Zur Orientierung über die Größenordnung sei mitgeteilt, daß *J. Loeb* (25) bei der Dialyse von 1 proz. Gelatinechloridlösung bei Anwesenheit von m/8 NaCl Unterschiede von 0,02 (= 5 Proz.) in der p_H der Außen- und Innenflüssigkeit gefunden hat. Es gehört jedenfalls zur Charakteristik der Dialysiermethode, daß *Dale* und *Evans* bei ihren Bestimmungen um 60 Proz. alkalischere Werte erhalten haben, als mit der elektrometrischen und als die Werte für Blut in der Literatur bekannt sind. Sie beziehen das, wie schon erwähnt, auf die Fehler der Elektrometrie in CO_2-haltigen Lösungen. Da aber die mit unserer Methode mittels Indikatoren erhaltenen Werte der Blut-p_H mit den elektrometrischen der Literatur bestens übereinstimmen, so scheint uns diese Erklärung nicht überzeugend [s. auch *Cullen* und *Baird* (2)]. Wir denken an einen eventuellen Verlust der Kohlensäure während der Dialyse usw.

Cullen (26) glaubt, daß es möglich wäre, die schwerfällige und heikle Dialyse dadurch zu vermeiden, daß er das Plasma oder Serum 20fach verdünnt und diese farblose und eiweißarme Verdünnung direkt zur kolorimetrischen Bestimmung mittels Phenolrot und Phosphatröhren nach *Sörensen* benutzt. Durch Vergleich mit elektrometrischen Bestimmungen hat er gefunden, daß die so erhaltenen Werte zwar nicht mit den elektrometrischen übereinstimmen, daß sie sich aber durch eine konstante Korrektur, welche „die Korrektion für den Proteineffekt, den Verdünnungseffekt und für den Temperatureffekt in sich schließt", korrigieren lassen; diese Korrektur soll für jede Tierart eine konstante und bei etwa 20facher Verdünnung von der Genauigkeit dieser Verdünnung praktisch unabhängige Größe darstellen. Auf diese Weise glaubt *Cullen* eine Genauigkeit von $p_H \pm 0{,}04$ (= 10 Proz.) erreichen zu können.

Leider sind wir nicht in der Lage, dem Gedankengang von *Cullen* folgen zu können. Seine Methode ist eine rein empirische, und eine rein empirische Methode scheint uns schon von vornherein ungeeignet zu sein zur Behandlung von so komplizierten Fragen, wie sie hier in Betracht kommen. Es besteht gar keine Garantie, daß die *Cullen*sche Korrektur tatsächlich für alle, also auch pathologische Fälle, eine Konstante wäre, und um so mehr, da diese Korrektur für verschiedene Tiersorten, aber auch für Plasma und Serum derselben Tierart große Unterschiede zeigt. Sie beträgt z. B. für Pferdeserum p_H 0,16, für Hundeserum dagegen p_H 0,35 (Unterschied von 70 Proz.!), für Menschenserum 0,18, für Menschenplasma 0,23 (Unterschied von 12 Proz.). Aber selbst unter gleichen Bedingungen (Plasma oder Serum derselben Tierart) und auf Grund der von *Cullen* selbst mitgeteilten Messungen geht es unserer Meinung nach nicht gut an, die *Cullen*sche Korrektur eine Konstante zu nennen. So fand er z. B. zwischen nur 15 Messungen an Pferdeplasma Abweichungen von p_H + 0,03 bis − 0,06 von der „Konstante" + 0,12; also Schwankungen in einer Breite von 25 Proz.! Bei zehn Fällen von Menschenplasma betrug die größte Deviation 10 Proz.

Diese Schwankungen der „Konstante" müssen bei etwas genauerem Nachdenken sehr verständlich erscheinen. Sie sind verursacht erstens durch die verschiedene Eigenfarbe der Sera, die selbst bei 20facher Verdünnung – wie wir es aus eigener Erfahrung wissen — noch lange nicht immer ausgeschaltet wird. Eine weitere Verdünnung ist aber wohl kaum möglich; wir kommen dann zu so pufferarmen Lösungen, an denen jede Messung illusorisch wird. Noch viel bedenklicher ist aber die Ausschaltung des Eiweißfehlers durch eine Korrektur; nicht nur weil Menge und Art der Serumeiweißkörper sehr großen Schwankungen unterworfen sind, sondern noch mehr darum, weil diese Größe, wie jede Reaktion zwischen Kolloiden, von sehr vielen, mehr oder weniger imponderabilen Einflüssen, daneben aber ganz roh von der aktuellen Reaktion, abhängt; so haben wir z. B. mit unserer zu beschreibenden Methode gefunden, daß der „Eiweißfehler" desselben 20fach verdünnten und das eine Mal mit etwas HCl, das andere Mal mit etwas NaOH versetzten Menschenplasmas für das von *Cullen* benutzte Phenolrot bei p_H 7,60 = − 0,20, bei p_H 2,30 aber nur = − 0,10 beträgt (Unterschied von 25 Proz.); für Neutralrot ist dieser Unterschied noch viel größer, bei p_H 7,65 0,56, bei p_H 7,20 0,18 (Unterschied von über 100 Proz.). Ein weiterer Nachteil besteht darin, daß das eiweißhaltige Plasma nicht nur auf die Nuance, sondern auch auf die Intensität der Indikatorenfarbe einwirkt, wodurch der Farbenvergleich erschwert wird. Auf die übrigen kleinen Unbequemlichkeiten der *Cullen*schen Methode möchten wir nicht eingehen; denn schon das Gesagte muß genügen, um die beschränkte Anwendbarkeit dieser Methode zu zeigen.

II. Eigene Methode.

a) Prinzip.

Wir glauben also, daß es erst uns gelungen ist, eine auch im klinischen Sinne einfache und dabei an Genauigkeit der elektrometrischen kaum nachstehende Indikatorenmethode zur Bestimmung der aktuellen Reaktion des Blutes ausgearbeitet zu haben.

Unsere Methode ist auf einen sehr einfachen Kunstgriff gegründet, den wir überhaupt zu kolorimetrischen p_H-Bestimmungen in trüben, gefärbten und eiweißhaltigen Lösungen empfehlen möchten.

Wir werden diesen Kunstgriff durch die vorerst schematische Beschreibung seiner Ausführung erläutern:

Je 2 bis 3 ccm des mit kohlensäurefreier, physiologischer NaCl-Lösung 10- bis 15fach verdünnten Plasmas, das schon den Indikator enthält, werden in zwei gleiche, unten flache und möglichst abgeschliffene Eprouvetten gebracht. In die eine Eprouvette kommen außerdem noch 0,5 ccm einer bekannten alkalischen, möglichst konzentrierten Phosphatlösung (Phosphatröhre), in die andere 1 ccm Verdünnungsflüssigkeit (Plasmaröhre). Wir lassen nun zur Phosphatröhre aus einer Mikrobürette so viel einer bekannten verdünnten Salzsäurelösung zufließen, bis beide Röhrchen von oben gesehen dieselbe Farbe zeigen[1]). Wir werden dazu etwa 0,5 ccm Salzsäurelösung verbrauchen. Am Ende der Titration haben beide Röhrchen denselben Gehalt an Eigenfarbe, an Salz sowie an Eiweiß; bei gleicher Farbe werden sie daher die gleiche p_H haben.

Diese p_H wird durch das Verhältnis Phosphat : Salzsäure bestimmt und kann aus einer geeichten Kurve sofort abgelesen werden. Das in der Phosphatröhre enthaltene Plasma hat keinen störenden Einfluß auf die aktuelle Reaktion; da am Endpunkt der Titration das Phosphat-Salzsäuregemisch und das Plasma die gleiche p_H haben, so verursacht ihr Zusammensein keine Änderung der p_H des Gemisches.

b) Blutentnahme und Verdünnung des Blutes

Die Verdünnung des Blutes ist notwendig, weil wir so mit kleineren Blutmengen auskommen, weil dadurch der notwendige luftdichte Verschluß — ohne Luftblase — des Blutes während des Zentrifugierens vereinfacht und überhaupt, infolge der Abnahme der CO_2-Tension, die Gefahr der Kohlensäureentweichung während aller Manipulationen verringert wird, und schließlich, weil durch die Reduktion der Eigenfarbe sowie des Eiweißgehaltes die p_H-Bestimmung mittels Indikatoren ceteris paribus erleichtert wird.

Die Verdünnung hat natürlich ihre Grenzen, weil durch eine zu weit gehende Verdünnung der Puffergehalt des Blutes und also die Widerstandskraft seiner Reaktion gegenüber imponderablen Einflüssen so sehr abnimmt, daß dadurch jede p_H-Bestimmung illusorisch werden kann. Wir pflegen im allgemeinen mit etwa 10- bis 15fachen Ver-

---

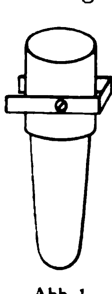
[1]) Auch *Dale* und *Evans* benutzten zur kolorimetrischen p_H-Bestimmung anstatt fertiger Eprouvetten nach *Sörensen* ein Titrationsverfahren mit verschiedenen Phosphatlösungen.

dünnungen (genaue Verdünnung ist nicht notwendig) zu arbeiten. Verdünnungen von 5- bis 20fach sind aber noch brauchbar.

Zehnfach verdünntes Blut ist etwa n/5000 an Kohlensäure; die Reaktion von 10 ccm einer solchen Verdünnung wird selbst durch einen Tropfen (0,04 ccm) von n/1000 Säure oder Lauge nur um weniger als 2 Proz. (λH 0,01) verschoben; es ist also praktisch hinreichend stabil.

Wir möchten aber schon jetzt bemerken, daß man bei kolorimetrischen p_H-Bestimmungen, speziell in pufferarmen Lösungen, eine peinliche Sauberkeit beobachten muß. Alle Geräte müssen vor der Bestimmung genau gereinigt werden; wir dürfen dabei nicht vergessen, daß destilliertes Wasser eigentlich eine Kohlensäurelösung ist, die von dieser Säure bis zu n/10000 enthalten kann. Da gewöhnliches Leitungswasser — glücklicher Zufall! — fast dieselbe Reaktion wie das Blut hat, so ist besser, alle Röhren, Pipetten nur mit Leitungswasser zu spülen und möglichst trocken zu gebrauchen. Besonders die zur schließlichen Titration gebrauchten Eprouvetten müssen sorgfältig behandelt werden; man soll sie zu anderen Zwecken überhaupt nicht gebrauchen.

Die Verdünnung geschieht sofort nach der Blutentnahme in gewöhnlichen Zentrifugierröhrchen von etwa 10 ccm Rauminhalt. Die Zentrifugierröhrchen sind zum luftdichten Verschluß mit einem kurzen Gummischlauch und mit einer kleinen (beim Zentrifugieren nicht störenden) Klemme montiert (Abb. 1). Sie enthalten die Verdünnungsflüssigkeit (s. später), mit der sie ganz gefüllt — ohne Luftblase — und geschlossen sind. Die Blutentnahme geschieht aus einer Vene mit Rekordspritze, nachdem zuerst die Stauung eine kurze Zeit aufgehoben wurde; bei der Blutentnahme darf sich in der Spritze keine Luftblase bilden. Das Blut (etwa 1 ccm zu einer Einzelbestimmung) wird sofort mit der Nadel möglichst auf den Boden der soeben geöffneten vollen Zentrifugierröhre gespritzt, so daß die Verdünnungsflüssigkeit überrinnt. Das Röhrchen wird sofort geschlossen — ohne Glasblase —, durchgeschüttelt und abzentrifugiert.


Abb. 1.

c) Die Verdünnungsflüssigkeit.

Soll die Verdünnung die Reaktion des Blutes nicht verändern, so muß sie mit einer ungepufferten, neutralen — natürlich kohlensäurefreien — Salzlösung geschehen, deren Wirkung auf die Aktivität der H-Ionen (im Sinne von *Bjerrum*) die gleiche ist, wie die Wirkung des Blutes.

Wir benutzen dazu eine Lösung, die zur Verhinderung der Gerinnung 0,2 Proz. Natriumoxalat und außerdem 0,73 Proz. Kochsalz enthält. (Es dürfen nur ganz einwandfreie und auf Neutralität geprüfte Reagenzien gebraucht werden!) Diese Lösung ist 0,155 n, ihre Nor-

malität entspricht also einer 0,9proz. „physiologischen" Lösung von Kochsalz. Oxalat hat in der von uns gebrauchten Konzentration keinen nennenswerten Einfluß auf die p_H des Blutes [*Corral* (27), *van Slyke* und *Cullen* (28), *Peters*, *Barr* und *Rule* (11)].

Die Wirkung dieser Lösung auf die Aktivität der Ionen ist praktisch dieselbe, wie die Wirkung des normalen Plasmas; durch Verdünnung mit ihr wird also die Reaktion des Blutes nicht verändert. Das läßt sich experimentell leicht nachweisen:

Wir nehmen in zwei gleiche, unten flach geschliffene Eprouvetten je 2 ccm Serum und versetzen beide mit der gleichen Menge m-Nitrophenol. Dieser Indikator ist unempfindlich gegen Eiweiß. Bei der Verdünnung der einen Eprouvette mit unserer Verdünnungsflüssigkeit bleibt die Farbe der beiden Eprouvetten, von oben gesehen, sich gleich.

Pathologische Blute mit abnormalem Salzgehalt können bei der Verdünnung mit physiologischer Salzlösung ihre Reaktion etwas ändern. Es handelt sich um denselben schon besprochenen Fehler, der sowohl der *Hasselbalch*schen Methode, wie auch allen p_H-Bestimmungen mit Verdünnung des Blutes (also auch der elektrometrischen Methode von *Michaelis*) anhaftet. Seine Größe wird wohl nur selten $\pm$ 5 Proz. erreichen.

Die Verdünnungsflüssigkeit muß CO_2-frei sein, da durch Vernachlässigung dieser Kautele Fehler bis zu 50 Proz. entstehen können. Als einfachste und sicherste Methode zur Herstellung kohlensäurefreier Lösungen möchten wir das Durchleiten von reinem Oxygen aus einer Bombe empfehlen. Zur Durchleitung und besseren Mischung des Gases benutzen wir eine an ihrem Ende kolbig verdickte Glasröhre mit einem dichten Kranz von feinen Löchern am Kolben. Es soll in einem kleinen Kolben immer nur die unmittelbar notwendige Menge Verdünnungsflüssigkeit und knapp vor Gebrauch von Kohlensäure befreit werden. Dazu genügen 3 bis 4 Minuten hinlänglich.

Durch Verdünnung mit einer mit O_2 oder auch nur mit Luft gesättigten Lösung wird natürlich das Hämoglobin des venösen Blutes in Oxyhämoglobin umgewandelt, ebenso wie das bei der Saturation des Blutes mit CO_2-haltiger Luft nach *Hasselbalch* geschieht. Ob dadurch das Blut um etwa p_H 0,02 saurer wird, wie das *Hasselbalch* (3), *Christiansen*, *Douglas* und *Haldane* (29), *Parsons* (12), *Joffe* und *Poulton* (30) usw. behaupten, oder ob dabei seine Reaktion unverändert bleibt, wie das speziell für oxalathaltiges Blut von *Haggard* und *Henderson* (31) gefunden wurde, dessen Entscheidung möchten wir einer späteren experimentellen Prüfung, die wir mit unserer Methode vorzunehmen gedenken, vorbehalten. Der Wert der Messungen wird durch diese Unsicherheit kaum beeinflußt, denn es handelt sich ja nur um eine im allgemeinen konstante Korrektur von etwa 5 Proz.

Aus vielfachen praktischen Gründen möchten wir unbedingt empfehlen, den Indikator schon der Verdünnungsflüssigkeit zuzumischen. Das soll aber möglichst erst nach der Durchleitung des Oxygens

geschehen, da sonst ein Teil des kolloiden Farbstoffes durch das Schütteln gefällt wird. Als Indikatoren kommen im Bereiche der Blut-p_H nur Neutralrot und Phenolrot in Betracht. Wir benutzen 0,3 prom. wässerige Lösungen, von denen wir auf 100 ccm Verdünnungsflüssigkeit 2 bis 3 ccm nehmen.

Phenolrot und Neutralrot sind Säuren, und so müssen wir bei ihrem Gebrauch darauf achten, daß wir ihren Einfluß auf die Reaktion der Plasmaverdünnung — den sogenannten „Säurefehler" von *Michaelis* — möglichst ausschalten. Es geschieht in diesem Sinne, wenn wir die Menge des Indikators bis an die mögliche untere Grenze herabdrücken. (Da Neutralrot eine bessere Färbekraft hat, so ist das schon ein Grund, es dem Phenolrot vorzuziehen; auch sonst gibt Neutralrot im Bereich der Blut-p_H feinere Ausschläge als Phenolrot; es bleibt schließlich Geschmackssache, welchen Indikator man gebraucht; wir möchten entschieden Neutralrot empfehlen.) Auch der Umstand, daß wir mit flachen Eprouvetten arbeiten, die wir von oben, also durch eine dickere Schicht, betrachten, trägt dazu bei, um mit wenig Farbstoff auszukommen. Eine noch geringere Menge Indikator als die von uns vorgeschlagene — manche Autoren machen kolorimetrische p_H-Bestimmungen mit noch verdünnteren Indikatorenlösungen — erschwert schon bedeutend die Unterscheidung von feineren Farbennuancen, speziell aber in dem trotz Verdünnung etwas gefärbten Plasma.

Die von uns gebrachte Verdünnung des Indikators genügt aber noch nicht, um den Säurefehler praktisch auszuschalten. Bei parallelen p_H-Bestimmungen im selben Blute, das wir aber zu der einen Reihe von Bestimmungen 5fach, zu der anderen aber 15fach verdünnt haben, fanden wir, speziell bei Gebrauch von Phenolrot, das verdünntere Plasma (wegen mangelhafter Auspufferung des Säurefehlers) um etwa p_H 0,06 saurer; bei Gebrauch von Neutralrot ist der Fehler zwar geringer, jedoch noch immer groß genug, um störend zu wirken.

Zur praktisch vollständigen Ausschaltung des Säurefehlers ist es notwendig, den Indikator schon im voraus mit etwas Lauge auf die ungefähr zu erwartende Reaktion — für Blut bei 18° C schwankt dieser Wert um p_H 7,5 — zu bringen. Zu diesem Zwecke versetzen wir die mit Indikator schon versehene Verdünnungsflüssigkeit mit einigen Tropfen einer ad hoc hergestellten etwa n/200fachen Natronlauge, bis die Mischung bei Gebrauch von Neutralrot orangefarbig wird. Will man genauer sein, so kann man eine physiologische Kochsalzlösung in Leitungswasser (p_H 7,6) oder eine entsprechende Phosphatmischung als Vorlage benutzen. Eine besondere Genauigkeit ist aber gar nicht notwendig, schon eine Einstellung zwischen p_H 7,2 bis 7,8 genügt, um den Säurefehler praktisch auszuschalten.

Es läßt sich leicht ungefähr berechnen, daß *ein* Tropfen mehr oder weniger n/200 Na(OH) auf 100 ccm Verdünnungsflüssigkeit die p_H der Plasmaverdünnung nur um etwa 1 Proz. verschiebt: 0,04 ccm n/200 Na(OH) auf 100 ccm n/500000 Na(OH); die CO_2-Konzentration des zehnfach verdünnten Blutes beträgt etwa n/5000, also das 100fache der Konzentration der erwähnten Natronlauge. (Das stark puffernde Hämoglobin wird noch dazu bei dieser Rechnung ganz vernachlässigt.)

Es ist schließlich zu erwähnen, daß durch die Neutralisation auch jener Fehler behoben wird, der durch die eventuell unvollständige Vertreibung der Kohlensäure aus der Verdünnungsflüssigkeit entstehen könnte. Wir betrachten es als Kriterium für die gelungene Ausschaltung des Säurefehlers, wenn verschiedene, verschieden starke Verdünnungen desselben Blutes, und zwar sowohl mit Neutralrot als mit Phenolrot, beim Titrieren dieselbe p_H ergeben.

Die Verdünnungsflüssigkeit wird also mit Oxygen von CO_2 befreit, mit Indikator versehen, durch einige Tropfen stark verdünnter Na(OH) bis etwa p_H 7,5 neutralisiert, in die montierten Zentrifugierröhrchen gefüllt und luftdicht verschlossen. Die Röhrchen müssen alle die gleiche Farbe zeigen. Nun kann die Blutentnahme erfolgen; danach werden die wieder geschlossenen Röhrchen zentrifugiert.

d) Das Titrieren.

Zum Titrieren brauchen wir einige kurze, 7 bis 8 cm lange Eprouvetten mit flachem, möglichst abgeschliffenem Boden, zwei Mikrobüretten, einige Pipetten, eine Lösung von n/100 Salzsäure in physiologischer Kochsalzlösung und eine m/7,5 Lösung von *Sörensen*schem Dinatriumphosphat, gelöst in n/100 Salzsäure (p_H=etwa 7,8). Diese Lösungen müssen nicht kohlensäurefrei sein; bei so konzentrierten Lösungen spielt der mögliche Kohlensäuregehalt keine Rolle mehr, außerdem werden diese Lösungen *samt Kohlensäure* geeicht.

Das Titrieren geschieht folgendermaßen: zuerst werden einige Eprouvetten (zu jeder Einzelbestimmung *eine*) aus einer Mikrobürette mit je 0,5 ccm der obigen Phosphatsalzsäurelösung (Phosphat-Salzsäure) gefüllt.

Um genau ausmessen zu können, muß die Kapillare des Bürettenhahns mittels Gummiansatz und Glaskapillare so verlängert werden, daß das Phosphat direkt auf den Boden der Eprouvette fließe, ohne daß nur ein Tropfen an der Wand hängen bleiben kann. Man kann so 0,5 ccm bis auf 0,01 ccm (2 Proz.) genau abmessen. Dadurch aber, daß das Phosphat schon Salzsäure, und zwar etwa die Hälfte der in normalen Fällen gebrauchten Menge enthält, kommt der Fehler des Abmessens beim Titrieren mit HCl im Durchschnitt nur halb zur Geltung.

Nachdem das zentrifugierte Plasma schon bereit steht, wird eine flache Eprouvette mit 1 ccm (entsprechend 0,5 ccm Phosphat + 0,5 ccm

zum Titrieren erwartungsgemäß notwendige Salzsäure) der CO_2-freien (in einer Eprouvette frisch mit O_2-durchströmten) Verdünnungsflüssigkeit gefüllt. Die O_2-durchströmte Lösung läßt sich unter Paraffin eine Zeitlang kohlensäurefrei halten. Jetzt erst wird das Zentrifugierröhrchen durch Abnahme des Gummiansatzes geöffnet, das Plasma abpipettiert und je 2,5 (oder 3) ccm davon in eine Eprouvette mit Phosphat (*Phosphatröhre*) und in eine mit Verdünnungsflüssigkeit (*Plasmaröhre*) gefüllt.

Dabei soll zuerst die Phosphatröhre gefüllt werden, aber ohne daß die Pipette irgendwie mit Phosphat in Berührung kommt. Beim Füllen, speziell der Plasmaröhre mit Plasma, muß auf die Vermeidung von CO_2-Verlust geachtet werden: die Pipette muß also in die Verdünnungsflüssigkeit untertauchen.

Das Plasma enthält schon den Indikator und kann sofort titriert werden. Wir lassen aus der Mikrobürette so viel Salzsäure zur Phosphatröhre zufließen, bis beide Eprouvetten, von oben gesehen, die gleiche Farbennuance zeigen. Den Gebrauch von Abblendekästen fanden wir nicht für notwendig. Es genügt, bei diffusem Tageslicht und auf glatter, weißer Unterlage zu titrieren und zur Abwehr des Seitenlichtes die Hand vor die Eprouvetten zu halten. Das Titrieren dauert bei einiger Übung nur 1 bis 2 Minuten; besondere Maßnahmen, um dem Entweichen von Kohlensäure vorzubeugen, sind überflüssig (man kann sich leicht überzeugen, daß die Plasmaröhre beim Stehen während 4 bis 5 Minuten ihre Farbe nicht ändert); nur dürfen die Eprouvetten, speziell aber die Plasmaröhre, nicht geschüttelt werden.

Die verbrauchte Menge Salzsäure wird notiert und die entsprechende p_H aus einer geeichten Kurve sofort abgelesen. Kontrollbestimmungen, auch mit verschiedenen Plasmaverdünnungen und verschiedenem Indikator, müssen bis auf p_H 0,02 übereinstimmen, was mit etwas Übung leicht zu erreichen ist. Sollten bei der ersten Bestimmung eines pathologischen Blutes nicht etwa 0,5 ccm, sondern sagen wir 0,2 oder 1 ccm HCl verbraucht werden, so werden wir bei den nächsten Kontrollbestimmungen anstatt 1 nur 0,7 ccm oder aber 1,5 ccm Verdünnungsflüssigkeit zur Plasmaröhre nehmen, damit am Endpunkt der Titration die Eiweiß- usw. Konzentration beider Eprouvetten dieselbe sei. Eine besondere Genauigkeit ist aber nicht notwendig; eine Differenz von 0,5 ccm im Volumen der Plasmaröhre macht beim Titrieren nicht einmal einen Unterschied von $p_H = 0{,}02$ aus.

Wir möchten raten, das Titrieren zuerst an „leeren“ Phosphatröhren einzuüben. Man nimmt zwei Phosphatröhren, versetzt sie mit Indikator und fügt zu der einen Röhre eine bekannte Menge unserer Salzsäurelösung zu. Dann wird — indem wir zu der anderen Röhre aus der Bürette Salzsäure zufließen lassen — bis zur Farbengleichheit titriert.

e) Das Eichen der Phosphat-Salzsäuregemische.

Wir geben zwar eine von uns geeichte Kurve (s. Abb. 2), welche die den beim Titrieren verbrauchten Salzsäuremengen entsprechende $p_H - s$ enthält, bei, doch möchten wir raten, die eigenen Lösungen möglichst selbst zu eichen. Am einfachsten geschieht das natürlich auf elektrometrischem Wege; beim Eichen wird das verdünnte Plasma in den Phosphat-Salzsäuregemischen durch Verdünnungsflüssigkeit (2,5 ccm auf 0,5 ccm Phosphat) ersetzt.

Wir selbst haben unsere Kurve, da wir über keine Gasketteneinrichtung verfügen, mittels der Indikatorenmethode ohne Puffergemische von *Michaelis* und *Gyemant* (23) geeicht und möchten diese Methode dazu sehr empfehlen. Wir haben einige kleine Änderungen bei der Durchführung der Methode vorgenommen, die sich uns sehr bewährt haben:

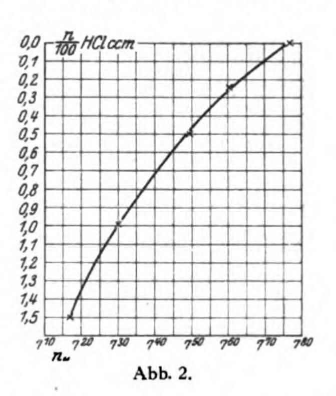


Abb. 2.

Anstatt Eprouvetten*reihen* arbeiteten wir nur mit zwei flachen Eprouvetten. Die eine Eprouvette enthält die zu messende Lösung, also in unserem Falle das Phosphat-Salzsäuregemisch, und dazu eine bekannte Menge m-Nitrophenol, die andere enthält die Lauge und wird aus einer Mikrobürette mit so viel verdünnter m-Nitrophenollösung versetzt, bis beide Eprouvetten, von oben gesehen, die gleiche Farbe zeigen. Aus dem Verhältnis der Nitrophenolmengen in beiden Eprouvetten wird der sogenannte Farbgrad berechnet. Durch mehrfache Kontrollen kann man bis zu 3 Proz. genau messen. Man muß mit möglichst konzentrierter Salzsäurelösung und wenig Indikator arbeiten, um den „Säurefehler" zu vermeiden.

Beispiel: Bestimmung jener p_H, die 0,5 ccm beim Titrieren verbrauchter Salzsäure entspricht. Wir mischen in einer gewöhnlichen Eprouvette 5 ccm unserer Phosphatlösung, 5 ccm unserer Salzsäure, 4 ccm Verdünnungsflüssigkeit und 1 ccm vierfach verdünnter m-Nitrophenollösung (Stammlösung = 1 : 300 = 0,027 n). Eigentlich sollten wir 25 ccm Verdünnungsflüssigkeit nehmen, dadurch wird aber der Puffergehalt der Mischung verringert, ohne daß sich bei Verdünnung über 5 ccm Verdünnungsflüssigkeit die p_H des Gemisches ändert. 5 ccm dieser Mischung kommen in eine flache Eprouvette, in die andere kommt etwa n/100 Na(OH). Beim Titrieren mit 20fach verdünnter Nitrophenollösung haben wir 0,270, 0,265, 0,275, 0,270, 0,275, im Durchschnitt 0,271 ccm Farbstofflösung verbraucht.

$$\text{Farbgrad } (F) = \frac{0{,}271}{20} : \frac{1}{4 \times 3} = 0{,}162, \text{ also } \varphi = \log \frac{F}{1 - F} = -0{,}71.$$

K m-Nitrophenol beträgt für Lösungen mit physiologischem Salzgehalt bei 20° C 8,20 [*Michaelis* und *Krüger* (18)] und p_H ist also 8,20 − 0,71

= 7,49. Der Salzsäuregehalt der gemessenen Lösung ist 0,0066 n, der Gehalt an Indikator $= \frac{0,027}{4 \times 15} = 0,00045$ n; der Säurefehler kommt also nicht in Betracht [s. *Michaelis* (14), S. 41]. Bei alkalischeren Lösungen kann man mit noch weniger Indikator auskommen.

f) Die Temperaturkorrektur.

Die Temperaturkorrektur unserer Methode wird sich aus dem Temperaturkoeffizienten der Blut-p_H bei konstantem Gehalt (nicht Druck!) an Kohlensäure und aus dem Temperaturkoeffizienten der p_H der Phosphatmischungen ergeben. Die letzte Größe beträgt aber nach Untersuchungen von *Michaelis* und *Garmendia* (32) sowie von *Walbum* (33) praktisch 0 (0,001 pro Grad). Aus den Untersuchungen von *Michaelis* und *Davidoff* (7), *Evans* (13), *Cullen* (2), sowie *Corral* (34) wissen wir, daß das Blut, wenn es ohne Verlust von Kohlensäure erwärmt oder abgekühlt wird, bei 38° C um p_H 0,20 bis 0,22 saurer als bei 18° C ist. Derselbe Wert ergibt sich, wenn wir — worauf *Corral* hingewiesen hat — *Hasselbalchs* Messungen, der gefunden hat, daß das Blut bei konstantem CO_2-*Druck* seine p_H zwischen 18 bis 38° C nicht verändert, mittels der verschiedenen Absorptionskoeffizienten der Kohlensäure bei diesen Temperaturen auf gleiche *Gehalte* an Kohlensäure umrechnen: $\alpha_{38} = 0,511$, $\alpha_{18} = 0,854$, $\log \alpha_{18} - \log \alpha_{38} = 0,22$.

Der Temperaturkoeffizient unserer Methode wird also pro Grad $p_H = 0,01$ betragen. Diese Größe muß für jeden Grad über 18° C zu dem in der Kurve angegebenen Wert addiert werden. Will man die Werte auf 38° C beziehen, so muß aus den Werten für 18° C 0,22 abgezogen werden.

Normale Werte.

Michaelis und *Davidoff* (7) fanden mit der elektrometrischen Methode im normalen menschlichen Blute bei 18° C Werte zwischen p_H 7,49 bis 7,63, im Durchschnitt 7,56. *Hasselbalch* (3) fand bei 38° C den Mittelwert von 7,33, was für 18° C umgerechnet 7,55 ergibt. Auch die übrigen, meist indirekt erhaltenen Werte der Literatur liegen für 38° zwischen p_H 7,26 bis 7,42 [s. *Höber* (4)], was für 18° C 7,48 bis 7,64 ergibt. Unsere eigenen Resultate an in diesem Punkte Normalen liegen zwischen p_H 7,50 und p_H 7,60 bei 18° C und zeigen den Mittelwert von p_H 7,54; sie sind also in bester Übereinstimmung mit den elektrometrisch erhaltenen Werten.

1.	Sine morbo	7,52
2.	,, ,,	7,52
3.	,, ,,	7,50
4.	,, ,,	7,51
5.	Hysteria	7,50
6.	Cholelithiasis	7,56
7.	Nephrolithiasis	7,59
8.	Appendicitis chronica	7,52
9.	Malaria reconv.	7,55
10.	Myelitis transv.	7,51
11.	Granulomatosis	7,58
12.	Polycythaemia	7,59
13.	Ulcus duodeni	7,55
14.	Asthma bronchiale (Anfallsfrei)	7,53
15.	Ulcus duodeni	7,59
16.	Hyperacititas	7,58
17.	Neurosis ventriculi	7,55
18.	Cat. apic.	7,51
19.	Myodegeneratio (comp.)	7,56
20.	,, ,,	7,60

Literatur.

1) *Evans*, Journ. of Physiol. **54**. – 2) *Cullen* and *Baird*, Journ. of biol. Chem. **52**. – 3) *Hasselbalch*, diese Zeitschr. **78**. – 4) *Höber*, Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe, 5. Aufl. – 5) *Bohr*, diese Zeitschr. **49**. – 6) *Haldane* und *Pristley*, Journ. of Physiol. **82**. – 7) *Michaelis* und *Davidoff*, diese Zeitschr. **46**. – 8) *Siebeck*, zit. nach *Straub* und *Meier* (22). – 9) *Kauders* und *Porges*, Wien. Arch. **5**. – 10) *Eppinger* und *Schiller*, ebendaselbst **2**. – 11) *Peters*, *Barr* and *Rule*, Journ. of biol. Chem. **45**. – 12) *Parsons*, Journ. of Physiol. **58**. – 13) *Evans*, ebendaselbst **55**. – 14) *Michaelis*, Die Wasserstoffionenkonzentration, 2. Aufl. – 15) *Michaelis* und *Rona*, diese Zeitschr. **67**. – 16) *Milroy*, Journ. of Physiol. **51**. – 17) *Schade*, Physikalische Chemie und innere Medizin. – 18) *Michaelis* und *Krüger*, diese Zeitschr. **119**. – 20) *Haggard* and *Henderson*, Journ. of biol. Chem. **39**. – 21) *Means*, *Bock* and *Woodwill*, Journ. of exper. Med. **33**. – 22) *Straub* und *Meier*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **138**. – 23) *Michaelis* und *Gyemant*, diese Zeitschr. **109**. – 24) *Dale* und *Evans*, Journ. of Physiol. **54**. – 25) *J. Loeb*, Journ. of gen. Physiol. **8**, 667. – 26) *Cullen*, Journ. of biol. Chem. **52**. – 27) *Corral*, diese Zeitschr. **72**. – 28) *Van Slyke* and *Cullen*, Journ. of biol. Chem. **30**. – 29) *Christiansen*, *Douglas* and *Haldane*, Journ. of Physiol. **48**. – 30) *Joffe* and *Poulton*, ebendaselbst **54**. – 31) *Haggard* and *Henderson*, Journ. of biol. Chem. **45**. – 32) *Michaelis* und *Garmendia*, diese Zeitschr. **67**. – 33) *Walbum*, ebendaselbst **107**. – 34) *Corral*, ebendaselbst **119**

V. Über die Einwirkung von Säuren auf die Hitzegerinnung des Pflanzenplasmas.

Von

Hugo Kahho.

(Aus dem pflanzenphysiologischen Laboratorium des botanischen Instituts der Universität Dorpat, Estland.)

(Eingegangen am 30. Oktober 1923.)

In einer früheren Mitteilung[1]) habe ich berichtet, daß die Alkalisalze die Hitzekoagulation des Pflanzenplasmas nach der lyotropen Reihe $CNS > J > \ldots SO_4$ beeinflussen.

Es schien mir wichtig nachzuprüfen, welchen Einfluß die saure Reaktion des Mediums auf diese Salzwirkung haben könnte.

Aus einer Untersuchung von *Lepeschkin*[2]) ist es bekannt geworden, daß die Hitzekoagulation von Pflanzenplasma bei Anwesenheit von Citronensäure bei einer niedrigeren Temperatur vor sich geht als ohne Säure.

Dieses trifft für die mit Zucker plasmolysierten Zellen zu. Da nun die Alkalisalze auf die Plasmagerinnung ein wenig verschieden wirken, fragt es sich, ob die Beeinflussung der Koagulationstemperatur durch Wasserstoffionen in Kombinationen mit verschiedenen Salzen immer dieselbe ist.

Um diese Frage zu beantworten, stellte ich einige Versuche mit Blattepidermiszellen von Zebrina pendula und Kronblattzellen von Viola tricolor an.

A. Versuche mit Zebrina pendula.

Die Bestimmungen der Koagulationstemperaturen wurden an den Mittelrippenzellen bzw. Epidermiszellen der Blattunterseite ausgeführt.

Die Versuchsanordnung war dieselbe wie die in meiner schon erwähnten Mitteilung[3]) bereits beschriebene. Nur das kleine gläserne parallelwandige Objektgefäß, das die Salzlösungen enthielt, war hier viel größer als das von mir früher benutzte, so daß man in dieses das Thermometer neben dem Schnitt placieren konnte.

---

[1]) *H. Kahho*, diese Zeitschr. **117**, 87, 1921.

[2]) Ber. d. deutsch. bot. Ges. **28**, 101ff., 1910.

[3]) Siehe hierzu noch diese Zeitschr. **120**, 125, 1921 (Berichtigung).

Die Mittelrippenzellen des erwähnten Versuchsobjekts koagulieren in Neutralsalzlösungen durchschnittlich leichter als die übrigen Epidermiszellen. Die Koagulationstemperatur der ersteren ist daher um einige Grade niedriger.

Es wurden mit einer jeden Salzlösung fünf Temperaturbestimmungen ausgeführt und aus diesen das Mittel gezogen. Für jede Versuchsserie, falls nicht anders angegeben, sind die Schnitte von demselben Blatte gewonnen. Die Beobachtungen sind an gleich dicken Stellen der Schnitte gemacht worden.

Die Normallösungen wurden mittels der Wage aus Präparaten von *Kahlbaum* hergestellt.

Tabelle I.

Kontrollversuche (neutral). Mittelrippenzellen. Konzentration der Lösungen 0,7 n.

Versuchsserie	Salze								
	KCNS	KJ	KBr	KNO_3	KCl	$KC_2H_3O_2$	K.Tartrat	K_2SO_4	K.Citrat
	Koagulationstemperatur in °C						Ungefähr bei		
1	61,7	63,8	64,1	66,1	66,7	67,7	68,9	69,6	70,0
2	61,9	63,4	65,0	65,2	66,5	67,4	69,2	70,7	71,5
3	63,1	64,0	64,4	64,7	65,1	66,5	69,0	68,0	70,5
4	62,4	64,4	64,2	65,0	65,7	66,2	69,2	70,7	72,1
5	61,6	64,4	64,2	64,1	65,4	67,0	68,7	68,7	70,7
Mittel	62,1	64,0	64,4	65,0	65,9	67,0	69,0	69,5	70,8
Völlige Entfärbung	ungefähr bei								
der Mittelrippenzellen	66	66	68	69	70	72	77	77	78

Versuchsdauer: bis zur Plasmakoagulation durchschnittlich 8,2 bis 12 Minuten; bis zur völligen Entfärbung der Mittelrippenzellen 10 bis 14,5 Minuten.

Wir sehen aus diesen Versuchen, daß die Salze die Koagulationstemperatur, wie wir das bereits gezeigt haben[1]), nach der lyotropen Reihe CNS $>$ ... SO_4 $>$ Citrat herabsetzen. Die individuellen Schwankungen, veranlaßt durch das Versuchsobjekt, können bei diesen Versuchen bisweilen ziemlich störend sein. Dieses begegnet uns, wenn z. B. die Schnitte von weit voneinander gelegenen Blatteilen gewonnen sind, wobei die Mittelrippenzellen eine verschiedene Größe haben. Ferner können auch Abweichungen in der Koagulationstemperatur aus anderen Gründen, noch ziemlich unbekannter Natur, vorkommen. Vermutlich spielt in einigen Fällen der verschiedene Säuregrad des Zellsaftes eine Rolle. Wir haben bei unseren Versuchen nur mit solchen Blättern operiert, die ziemlich gleichmäßige Resultate ergaben. Aus

[1]) Vgl. *Kahho*, a. a. O.

diesem Grunde dürfte der Versuchsfehler bei den Mittelwerten schätzungsweise die Grenzwerte 0,5 bis 1,0° nicht übersteigen.

Die Unterschiede in den Wirkungen von Jodiden und Bromiden auf die Koagulationstemperatur, ferner die von Bromiden und Nitraten liegen innerhalb der Grenzen des Versuchsfehlers. Dasselbe gilt auch für die Tartrate und Sulfate. Daher kann man die Anionenreihe der Kontrollversuche so schreiben: CNS > J, Br, NO_3 > Cl > $C_2H_3O_2$ > Tartrat, SO_4 > Citrat. Beim Tartrat, Sulfat und Citrat weichen die Merkmale der Plasmakoagulation etwas von denen bei den übrigen Salzen ab[1]), und aus diesem Grunde ist die Koagulationstemperatur bei den erstgenannten Salzen in den Tabellen mit „ungefähr" bezeichnet.

Wenden wir uns jetzt der Wirkung der Säure bei der Plasmakoagulation zu.

Tabelle II.

Alle Salze 0,7 n + 0,003 n HCl in der Lösung[1]). Mittelrippenzellen.

Versuchsserie	Salze								
	KCNS	KJ	KBr	KNO_3	KCl	$KC_2H_3O_2$	K_2Tartrat	K_2SO_4	K_3Citrat
	Koagulationstemperatur in °C						Ungefähr bei		
1	57,0	58,0	58,5	61,0	62,9	66,1	66,7	67,0	68,0
2	57,2	57,7	59,0	59,2	60,5	65,4	67,7	67,0	68,2
3	57,0	58,5	58,5	59,7	61,0	65,2	68,0	66,4	67,8
4	55,5	57,5	57,7	58,6	62,0	65,0	68,0	66,6	68,0
5	56,5	57,5	58,0	59,5	62,1	64,5	67,7	68,5	69,5
Mittel	56,6	57,8	58.3	59,6	61,7	65,2	67,6	67,1	68,3
Völlige Entfärbung der Mittelrippenzellen	ungefähr bei								
	62	63	64	64	65	68	76	72	75

Versuchsdauer: bis zur Plasmakoagulation durchschnittlich 7,5 bis 11 Minuten; bis zur völligen Entfärbung der Mittelrippenzellen 9 bis 13,5 Minuten.

Wie man aus den Mittelwerten der Tabelle II entnehmen kann, ändert das saure Medium prinzipiell den Einfluß der Salze auf die Hitzekoagulation nicht. Wir haben hier dieselbe Anionenreihe: CNS > J, Br > NO_3 > Cl > $C_2H_3O_2$ > SO_4, Tartrat > Citrat. Der abweichenden Stellung des Sulfats im Vergleich mit den Kontrollversuchen ist kein Wert beizulegen, da die Wirkungsdifferenz zwischen diesem Salz und dem Tartrat in den Grenzen des Versuchsfehlers liegt.

Im ganzen sind aber die Koagulationstemperaturen unter dem Einfluß der Säure gegebenenfalls bei allen Salzen niedriger als ohne

[1]) Die betreffende Konzentration der Säure wurde durch die Verdünnung einer n-Lösung von *Kahlbaum* hergestellt.

Säure. Diese Depression der Koagulationstemperatur ist bei allen untersuchten Salzen keineswegs immer die gleiche, wie uns das der Vergleich der Temperaturdifferenzen neutral—sauer zeigt.

CNS °C	J °C	Br °C	NO_2 °C	Cl °C	$C_2H_3O_2$ °C	Tartrat °C	SO_4 °C	Citrat °C
— 5,5	— 6,2	— 6,1	— 5,4	— 4,2	— 1,8	— 1,6	— 2,4	— 2,5

Wir sehen aus diesem Vergleich, daß bei Anwesenheit der Säure die Temperatur der Plasmakoagulation bei den ersten Gliedern der lyotropen Reihe (CNS bis Cl) bedeutend niedriger ist als bei den letzten. Bis zum gewissen Grade ist die Abnahme der Temperaturdifferenzen in der Richtung der Lyotropie eine ziemlich regelmäßige, und es ist wahrscheinlich, daß die Abweichungen von der regelmäßigen Abnahme dieser Differenzen durch die Individualität der Zellen und durch den Versuchsfehler bedingt sind.

Im allgemeinen dehnen sich die Temperaturintervalle zwischen den einzelnen Salzen der lyotropen Reihe im sauren Medium mehr aus als im neutralen. Der Abstand der extremen Koagulationstemperaturen (zwischen CNS und Citrat) ist ohne Säure bei den Mittelwerten $70{,}8^0 - 62{,}1^0 = 8{,}7^0$, bei Anwesenheit von HCl $68{,}3^0 - 56{,}6^0 = 11{,}7^0$. Im sauren Medium liegen also die Temperaturen der Hitzekoagulation des Plasmas in Rhodanid- und Citratlösungen auf 3^0 weiter voneinander als im neutralen. Infolgedessen sind auch die Temperaturunterschiede bei den in der Reihe nebeneinanderstehenden Salzen, abgesehen von einigen Ausnahmen, im allgemeinen unter dem Einfluß der Säure größer, wie das aus der angeführten Nebeneinanderstellung folgt.

Unterschiede zwischen den Koagulationstemperaturen, die durch die in der lyotropen Reihe nebeneinanderstehenden Salze bewirkt sind:

	CNS °C	J °C	Br °C	NO_3 °C	Cl °C	$C_2H_3O_2$ °C	Tartrat °C	SO_4 °C	Citrat °C
Neutral . .	1,9	0,4	0,6	0,9	1,1	2,0	0,5	1,3	
Sauer . . .	1,2	0,5	1,3	2,1	3,5	2,4	— 0,5	1,2	

Aus dem Angeführten folgt, daß die Beeinflussung der Hitzekoagulation des Plasmas durch Neutralsalze im sauren Medium besser ausgeprägt ist als im neutralen, denn im ersten Falle fällt die lyotrope Temperaturreihe steiler als im letzteren ab.

Nehmen wir eine schwächere Konzentration der Säure, so bleibt alles prinzipiell dasselbe: die Temperaturkurve in der Richtung $SO_4 \longrightarrow$ CNS fällt auch hier steiler ab als ohne Säure, und die extremen Punkte der lyotropen Temperaturkette liegen demgemäß auch weiter

voneinander entfernt. Doch können sich die Kurven in einigen Fällen schneiden, wie dieses aus den Daten der Tabelle III folgt.

Tabelle III.

Neutral. Konzentration der Lösungen 0,6 n. Epidermiszellen[1]).

Versuchsserie	Salze						
	KJ	KBr	KNO_3	KCl	$KC_2H_3O_2$	K-Tartrat	K_2SO_4
	Koagulationstemp. in °C				Ungefähr bei		
1	68,5	67,5	69,1	70,4	74,1	73,1	76,4
2	67,6	64,6	68,3	69,8	73,5	74,2	76,6
3	68,8	65,4	68,9	71,0	72,8	74,5	—
4	68,2	66,4	70,4	71,0	71,1	73,0	76,5
5	68,5	67,5	70,6	71,2	73,1	75,1	—
Mittel	68,3	66,2	69,4	70,6	72,9	73,9	76,5
Entfärbung des				ungefähr bei			
Schnittes	75	75	76	76	78	87	88

Alle Salze 0,6 n + 0.001 n Oxalsäure[2]) in der Lösung.

Versuchsreihe	Salze						
	KJ	KBr	KNO_3	KCl	$KC_2H_3O_2$	K-Tartrat	K_2SO_4
	Koagulationstemp. in °C				Ungefähr bei		
1	65,3	64,6	70,4	70,7	74,2	76,2	77,0
2	66,9	67,2	70,8	70,8	74,0	76,8	77,1
3	65,3	64,1	69,7	72,4	75,0	75,2	76,8
4	66,2	63,7	69,6	70,9	74,2	75,8	77,2
5	67,1	67,2	—	72,3	73,8	75,4	76,5
Mittel	66,1	65,3	70,1	71,4	74,2	75,9	76,9
Entfärbung des				ungefähr bei			
Schnittes	72	72	75	76	81	87	91

Aus den Mittelwerten der Tabelle III erhalten wir folgende Temperaturdifferenzen. (Mit Minus sind diejenigen Differenzen der Koagulationstemperatur bezeichnet, die niedriger als die Temperatur des neutralen Mediums liegen, mit Plus die höher liegenden.)

J °C	Br °C	NO_3 °C	Cl °C	$C_2H_3O_2$ °C	Tartrat °C	SO_4 °C
— 2,2	— 0,9	+ 0,7	+ 0,8	+ 1,3	+ 2,0	+ 0,4

Wir sehen, daß bei dieser Konzentration der Säure die Koagulationstemperaturen nur in Lösungen von Jodiden und Bromiden niedriger sind als im neutralen Medium; in den Lösungen der übrigen Salze sind sie dagegen höher.

[1]) Alle Schnitte sind von demselben Blatte hergestellt.

[2]) Die Schnitte für die erste bis dritte Serie sind von einem Blatte, die für die vierte und fünfte Serie vom anderen Blatte genommen. Die Säurelösung ist mittels Wage hergestellt.

Der Charakter der angeführten Temperaturdifferenzen ist aber im Grunde genommen derselbe, wie wir das bei den Mittelwerten der Tabellen I und II bereits gesehen haben. Im letzteren Falle liegen die Koagulationstemperaturen in sauren Lösungen alle niedriger als in den neutralen, und die beiden Temperaturen laufen in der Richtung $SO_4 \rightarrow CNS$ auseinander. Hier (Tabelle III) aber schneiden sich die beiden Kurven. Ziemlich analog würden sich die Daten der Tabellen I und II verhalten, wenn wir die Koagulationstemperaturen des sauren Mediums alle etwa auf 5^0 erhöhen würden. In diesem Falle würden die Temperaturdifferenzen der ersten Glieder der lyotropen Reihe (J bis NO_3) ebenso negativ, die der übrigen positiv sein.

B. Versuche mit Viola tricolor.

Ein sehr günstiges Objekt für die Untersuchung der Hitzekoagulation des Pflanzenplasmas sind die Kronblätter von Viola tricolor. Es wurde mit einer Gartenform experimentiert, die samtschwarze Blüten hatte. Die Schnitte wurden von der Oberseite des Kronenblattes hergestellt. Die reichlich anthocyanführenden Zellen ermöglichen in stark plasmolysiertem Zustande sehr leicht und exakt die Temperatur der Hitzegerinnung der Plasmamembran zu bestimmen. Dabei kommt bei einer großen Anzahl der Salze das von uns bereits beschriebene Platzen[1]) des plasmolysierten Protoplastes zustande, das ungefähr dem ähnlich aussieht, wenn man in Wasser eine Heidelbeere zerquetscht.

Es wurden in den meisten Fällen mit einer Salzlösung drei Bestimmungen ausgeführt. Die bei jedem Versuch in der Tabelle IV angegebenen zwei Zahlen bedeuten: die eine diejenige Temperatur, bei welcher die Plasmakoagulation soeben beginnt, die andere, wenn sie schon einen massenhaften Charakter trägt. Jede Nummer des Kronblattes bedeutet, daß alle Schnitte von demselben Kronblatt hergestellt sind.

Die Ergebnisse der Tabelle IV zeigen uns, daß auch bei Viola die Koagulationstemperatur in einigen Fällen im sauren Medium niedriger ist als im neutralen. Im sauren Medium verliefen die Versuche nicht alle in gleicher Weise.

Im allgemeinen kann man bei Viola zwei Koagulationstypen unterscheiden, die bei Tradescantia nicht so scharf ausgeprägt sind. In den Lösungen der Rhodanide, Bromide, Nitrate und Chloride der Alkalien und des Magnesiums werden die Randzellen des Schnittes kurz vor der Koagulation feuerrot, ein Zeichen, daß hier die Säure am leichtesten in die Zellen eindringt. Es entsteht am Rande des Schnittes ein roter Streifen von Zellen, der allmählich immer breiter wird und

---

[1]) Vgl. *Kahho*, diese Zeitschr. 117, 87, 1921.

Tabelle IV.

Alle Salze 1 Mol.

Versuchsnummer	Koagulationstemperatur in °C		Nr. des Kronblattes	Koagulationstemperatur in °C		Nr. des Kronblattes
	NaCNS			**LiBr**		
	Neutral	+ n/350 HNO_3		Neutral	+ n/350 HNO_3	
1	49,8—52,2	37,3—46,0		59,5—61,0	49,4—54,6	1
2	50,5—53,5	37,0—45,7	1	60,2—61,3	47,5—51,0	2
3	51,0—54,5	36,8—46,2		58,3—59,7	50,0—54,5	3
Mittel . .	**51,9**	**41,5**		**60,0**	**51,1**	
	KNO_3			**$NaNO_3$**		
	Neutral	+ n/350 HNO_3		Neutral	+ n/350 HNO_3	
1	58,0—61,5	42,5—48,0		56,3—57,7	46,0—50,0	
2	59,2—61,3	42,2—47,8	1	57,5—61,5	46,5—52,5	1
3	59,5—61,3	43,5—48,5		58,6—63,4	47,3—53,7	
Mittel . .	**55,1**	**45,4**		**59,1**	**49,8**	
	KCl			**NaCl**		
	Neutral	+ n/350 HNO_3		Neutral	+ n/350 HNO_3	
1	59,7—61,8	48,5—53,5	1	60,0—62,0	49,3—57,7	1
2	59,6—62,4	49,0—54,2		59,5—61,5	48,6—57,4	2
3	— —	49,5—54,2	2	59,5—61,5	49,5—58,0	
Mittel . .	**60,9**	**51,5**		**60,6**	**53,4**	
	LiCl			**$KC_2H_3O_2$**		
	Neutral	+ n/350 HNO_3		Neutral	+ n/350 HNO_3	
1	57,5—60,5	52,6—57,4	1	61,2—63,3	62,7—64,8	1
2	57,0—58,5	51,3—57,2	2	62,0—64,0	61,6—62,4	2
3	58,0—60,0	50,0—55,0	3	61,0—63,5	60,5—62,0	
Mittel . .	**58,6**	**53,9**		**62,5**	**62,8**	
	$LiC_2H_3O_2$			**Na-Tartrat**		
	Neutral	+ n/350 HNO_3		Neutral	+ n/350 HNO_3	
1	59,8—63,2	58,7—61,3	1	63,7—69,3	61,2—66,8	
2	58,7—61,3	59,0—63,0	2	63,5—67,0	61,0—66,0	1
3	58,8—62,0	58,0—61,5		63,5—67,5	61,8—67,2	
Mittel . .	**60,6**	**60,2**		**65,7**	**63,9**	
	Li_2SO_4			**K-Citrat**		
	Neutral	+ n/350 HNO_3		Neutral	+ n/350 HNO_3	
1	64,3—68,9	65,8—68,2	1	60,0—63,7	60,0—63,5	1
2	63,5—69,5	63,4—68,6	2	60,4—63,6	60,3—63,7	2
3	61,5—69,0	62,8—68,2	3	60,5—64,2	59,8—64,5	
Mittel . .	**66,1**	**66,2**		**62,0**	**61,9**	
	Li-Citrat n/2			**$MgCl_2$**		
	Neutral	+ n/350 HNO_3		Neutral	+ n/350 HNO_3	
1	64,6—68,4	65,2—67,3	1	61,5—63,5	57,5—62,5	1
2	64,0—69,0	63,7—67,0	2	61,8—64,2	57,0—63,0	
3	— —	63,0—68,0		— —	— —	
Mittel . .	**66,5**	**65,5**		**62,7**	**59,9**	
	$Ca(CNS)_2$			**$CaCl_2$**		
	Neutral	+ n/350 HNO_3		Neutral	+ n/350 HNO_3	
1	39,3—45,7	37,5—45,5	1	57,5—60,0	56,0—60,5	1
2	37,0—44,0	36,3—43,7		56,5—59,0	56,8—60,2	
Mittel . .	**41,4**	**40,7**		**58,2**	**58,3**	

zur Mitte des Schnittes weiterrückt. Die Zellen koagulieren gleich nach der Rötung und in der Regel bei viel niedrigerer Temperatur als gewöhnlich. Eine kleine Menge der roten Zellen erscheint bisweilen an den Rändern schon gleich nach dem Übertragen der Schnitte in Lösungen. Das sind wahrscheinlich die bei der Herstellung des Schnittes beschädigten Zellen, da sie sich in der Regel an den dünnsten Stellen des Schnittes befinden.

In den Lösungen der Acetate, Tartrate, Sulfate und Citrate der Alkalien, sowie auch in den der untersuchten Salze von Calcium fehlt die beschriebene Rötung der Zellen vollständig, auch während der Koagulation, so daß die letztere bei Anwesenheit von Säure in gleicher Weise vor sich geht wie ohne Säure.

Um die Übersicht der Versuche mit Viola tricolor zu erleichtern, sind die Temperaturdifferenzen der Mittelwerte der Tabelle IV in folgender Übersichtstabelle zusammengefaßt. Mit Minus ist die Depression der Koagulationstemperatur durch die Säure bezeichnet.

Übersichtstabelle der Versuche mit Viola tricolor.

Anion \ Kation	K	Na	Li	Mg	Ca
	°C				
CNS . . .	—	— 10,4	—	—	— 0,7
Br	—	—	— 8,9	—	—
NO_3 . . .	— 9,7	— 9,8	—	—	—
Cl	— 9,4	— 7,2	— 4,7	— 2,8	+ 0,1
$C_2H_3O_2$ . .	— 0,2	—	— 0,4	—	—
Tartrat . .	—	— 1,8	—	—	—
SO_4	—	—	+ 0,1	—	—
Citrat . . .	— 0,1	—	— 1,0[1])	—	—

Die Übersichtstabelle zeigt uns, daß Neutralsalze die Säurewirkung auf die Plasmakoagulation in additiver Weise beeinflussen, wobei diese Beeinflussung durch die Anionen nach der lyotropen Reihe von Rhodanid zu Citrat und durch die Kationen nach der bekannten Fällungsreihe K, Na, Li, Mg, Ca abnimmt. Ferner sehen wir, daß bei denjenigen Salzen, wo die oben besprochene Rötung der Zellen stattfindet (in der Übersichtstabelle mit einer Punktierlinie umgrenzt), die Koagulationstemperatur des Plasmas bedeutend niedriger liegt als bei den sich nicht rötenden Schnitten. Die ausnahmsweise große Temperaturdifferenz bei Li-Citrat (1,0°) ist durch die niedrigere Konzentration der angewandten Salzlösung erklärlich.

Theoretisches.

Die Tatsache, daß schwache Konzentrationen von Säuren in Neutralsalzlösungen die Hitzekoagulation des Plasmas in einer Gesetzmäßigkeit

[1]) Konzentration der Lösung m/2.

beeinflussen, die in erster Linie bei den Kolloidlösungen vorkommt, zeigt uns, daß wir es hier mit einem kolloidchemischen Phänomen zu tun haben. Wir haben schon in früheren Arbeiten[1]) die Meinung geäußert, daß die Neutralsalze ihrer Kolloidaktivität gemäß die Plasmaoberflächenkolloide zu verfestigen bzw. aufzulockern vermögen und infolgedessen die Permeabilität der Plasmamembran weitgehend beeinflussen können. Fügt man zu einem gut eindringenden Salze (z. B. KNO_3) eine kleine Menge eines sehr langsam in die Zelle eindringenden Salzes, wie $CaCl_2$ (oder Na_2SO_4) hinzu, so wird die Permeabilität des Plasmas für das erste Salz auffallend stark herabgesetzt und die Giftwirkung desselben aufgehoben bzw. stark vermindert. Bei diesem Vorgang spielen die Adsorptionsprozesse keine dominierende Rolle, da besonders bei den Alkalisalzen die Anionenreihe der antagonistischen Wirkung eine entgegengesetzte Richtung im Vergleich mit der Adsorptionsreihe hat. So werden die Anionen von der Tierkohle nach *Rona* und *Michaelis* nach der lyotropen Reihe: $CNS > J > NO_3 > \ldots SO_4$ adsorbiert[2]), während die antagonistische Wirkung bei den schwach adsorbierbaren Salzen, wie das Sulfat, Citrat und andere am besten bei Alkalisalzen zutage tritt. Die ersten Glieder der lyotropen Reihe CNS, J und andere fördern sogar die Giftwirkung eines anderen Alkalisalzes[3]). Bei den Kationen dagegen fällt die Adsorptionsreihe mit der Reihenfolge der antagonistischen Wirksamkeit zusammen.

Zu unseren Versuchen übergehend, bemerken wir, daß die Koagulationstemperatur des Plasmas in der Lösung eines Salzes durch die Säure um so weniger herabgesetzt wird, je größer die antagonistische Wirkung eines Salzes ist. Diese antagonistische Wirkung äußert sich hier darin, daß in den Lösungen gewisser Salze die Säure sehr wenig oder gar nicht in die Zelle gelangt. Hat eine Säurelösung in die Zelle freien Zutritt, so geht die Hitzekoagulation im Moment des Eintritts der Säure (vorausgesetzt, daß sie nicht zu schwach ist) in der Regel bei einer viel niedrigeren Temperatur vor sich als ohne Säure. Bei Kronenblattzellen von Viola wird das Eindringen der Säure durch den Umschlag der Anthocyanfarbe ins Feuerrote gekennzeichnet. Je weniger ein Neutralsalz das Eindringen der Säure hindert, desto niedriger ist die Koagulationstemperatur im Vergleich zu derjenigen mit dem Salz allein. Da bei einem Teil der Salze der Anthocyanumschlag in saurem Medium bei Violaschnitten, bei welchen das sonst sehr deutlich sichtbar ist, gänzlich fehlt, so können wir daraus schließen, daß bei Anwesenheit dieser Salze die Säure hier gar nicht oder in sehr geringen Mengen in die Zelle eindringt. Diese antagonistisch wirkenden Salze brauchen aber keineswegs immer mit einem zweiwertigen Kation zu sein, sie können auch ein einwertiges Kation haben, welches in diesem Falle mit einem Anion verbunden sein muß, das in der lyotropen Reihe mehr oder weniger am Ende steht (Acetate, Tartrate, Citrate, Sulfate).

So hemmen z. B. alle diejenigen Salze des Kaliums, Natriums und Lithiums den Eintritt der Säure in die Zelle, die in der Übersichtstabelle von der Punktierlinie nach unten stehen. Die Temperaturdifferenzen neutral—sauer sind hier in den meisten Fällen so klein, daß sie sowohl von der Individualität der Schnitte als auch von dem Versuchsfehler herstammen.

---

[1]) Diese Zeitschr. **120**, 125; **123**, 284, 1921.

[2]) Zit. nach *Handowsky*, Leitfaden der Kolloidchemie, 1922, S. 80.

[3]) Vgl. *Kahho*, diese Zeitschr. **123**, 284, 1921.

Am besten tritt die hemmende Wirkung der Neutralsalze auf das Eindringen der Säure in die Zelle zutage, wenn die Säurelösung nicht zu schwach ist, wie bei unseren Versuchen mit HCl und HNO_3. Bei einer schwächeren Konzentration der Säure (s. Tabelle III) setzt sie die Koagulationstemperatur nur bei den ersten Gliedern der lyotropen Reihe (Rhodanide, Jodide, Bromide) herab, d. h. sie dringt hier in solchen Mengen in das Plasma, daß dadurch die Hitzegerinnungstemperatur beeinflußt wird. Bei den übrigen Salzen der Reihe beeinflußt die Säure bei dieser Konzentration die Hitzekoagulation schon mehr oder minder antagonistisch.

Wenn wir die Ergebnisse unserer Versuche mit den Erfahrungen, die bei den bekanntesten Zustandsänderungen der Kolloide gewonnen sind, vergleichen, so sehen wir, daß die Ionenreihen am besten mit denen der Gelatinequellung übereinstimmen. Bekanntlich ist seitens mehrerer Forscher gefunden worden, daß die Sulfate, Tartrate, Citrate und Acetate der Alkalisalze die Quellung der Gelatine hemmen. Dieselben Salze hemmen auch bei unseren Versuchen den Eintritt der Säure in die Zelle, und die Säure hat besonders bei Viola keinen Einfluß auf die Koagulationstemperatur des Plasmas. Die quellungsfördernden Alkalisalze: Chloride, Nitrate, Bromide und Rhodanide, die von Cl^- bis CNS^- in immer stärkerem Grade quellend wirken, fördern auch bei unseren Versuchen das Eindringen der Säure in die Zelle. Bei allen diesen Salzen zeigt sich bei steigender Temperatur ein deutlicher Umschlag des Anthocyanfarbstoffs ins Rote und eine mehr oder minder starke Depression der Koagulationstemperatur. Es muß hier hervorgehoben werden, daß in den Lösungen von LiCl und $MgCl_2$ der Farbenumschlag schon bedeutend träger vor sich geht und diese Salze hier einen Übergang von den quellungsfördernden zu den quellungshemmenden bilden, obwohl sie den letzteren näher stehen.

Dagegen $CaCl_2$ wie auch $Ca(CNS)_2$ gehören nach ihrem Benehmen zur quellungshemmenden bzw. permeabilitäthemmenden Gruppe. Diese Versuche zeigen ein gutes Übereinstimmen mit den Befunden von *Brenner*[1]). Er fand, daß bei Anwesenheit gewisser Neutralsalze, wie Magnesium- und Calciumchlorid, die Pflanzenzellen höhere Konzentrationen der Salzsäure ertragen als ohne diese Salze.

Neuerdings hat *Hansteen-Cranner*[2]) in einer sehr gediegenen Arbeit gezeigt, daß durch kolloidaktive Salze die Plasmakolloide auf der Zelloberfläche verdichtet (gefällt) werden können, wodurch auch die Permeabilität der Zellen dementsprechend beeinflußt wird. Es seien hier noch die sehr interessanten Versuche von *Walter*[3]) erwähnt, der nachwies, daß das lebende Plasma der Pflanzenzellen denselben Quellungsgesetzen unterworfen ist wie die toten Kolloide.

Zusammenfassung.

1. Die Koagulationstemperatur des Plasmas der Pflanzen Zebrina pendula und Viola tricolor wird in äquimolekularen Lösungen der Neutralsalze durch schwache Konzentrationen der Säuren (HCl, HNO_3, COOH—COOH von etwa n/300 an und niedriger) herabgesetzt,

[1]) Ber. d. deutsch. bot. Ges. **38**, 277, 1920.
[2]) Meldinger fra Norges Landbruckshoiskole **2**, 1922.
[3]) Jahrb. f. wiss. Bot. **62**, 145, 1923; Habilitationsschrift.

wobei diese Erscheinung in engem Zusammenhange mit der Kolloidaktivität der Neutralsalze steht.

2. Diese Depression der Koagulationstemperatur ist am besten bei den ersten Gliedern der lyotropen Ionenreihe (Rhodaniden, Jodiden) ausgeprägt, und sie nimmt allmählich in der Richtung CNS $\longrightarrow$ SO_4 ab, wobei die schwächeren Konzentrationen der Säure (n/1000 Oxalsäure) bei den meisten Salzen der lyotropen Reihe inaktiv sind bzw. eine kleine Erhöhung der Koagulationstemperatur erkennen lassen.

3. Für die untersuchten Kationen gilt die Reihenfolge K $>$ Na $>$ Li $>$ Mg $>$ Ca. Hier wird die Koagulationstemperatur durch Säure am stärksten bei den Kaliumsalzen, am schwächsten bei den Magnesiumsalzen herabgesetzt. Bei Anwesenheit von Calciumsalzen bleibt die Koagulationstemperatur durch Säure fast unbeeinflußt.

4. Die Depression der Koagulationstemperatur des Pflanzenplasmas durch Säuren bei Anwesenheit von Neutralsalzen ist eine Permeabilitätserscheinung und hängt sowohl von der Menge der in die Zelle eingedrungenen Säure, als auch von der Geschwindigkeit des Eindringens ab. Dieses läßt sich durch den Farbenumschlag des Anthocyans des Zellsaftes nachweisen.

5. Die Salze lassen bei der Beeinflussung der Permeabilität des Plasmas für Säuren eine gute Übereinstimmung mit den Quellungsprozessen der toten Kolloide erkennen. Die quellungsfördernden Salze fördern, ihrer Kolloidaktivität entsprechend, auch das Durchrdingen der Säure durch das Plasma; die quellungshemmenden Salze dagegen setzen die Permeabilität des Plasmas für Säuren herab.

Über den Mechanismus der serologischen Luesreaktionen.

Zugleich ein Beitrag zur besseren Kennzeichnung der Eiweißfraktionen des menschlichen Blutserums.

Von

Rudolf Stern.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für physikalische Chemie und Elektrochemie.)

(Eingegangen am 24. September 1923.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

So unbestreitbar der ungeheure praktische Nutzen ist, den die *Wassermann*sche Reaktion und späterhin auch besonders die von *Sachs-Georgi* und *Meinicke* der Diagnostik und damit der Therapie der Syphilis gebracht hat, so umstritten und rätselhaft ist heute noch, 17 Jahre nach ihrer Entdeckung, ihr eigentliches Wesen, ihre Theorie. Die ursprüngliche Annahme, daß das Serum des Luetikers einen echten Ambozeptor gegen die Erreger der Syphilis enthält, mußte aufgegeben werden, als *Landsteiner* (1), *Mueller* und *Poetzl*, sowie *Porges* (2) und *Meier* gezeigt hatten, daß das von *Wassermann* verwendete Antigen durch unspezifische Organextrakte, ja sogar durch künstliche Lipoidgemische ersetzt werden kann, ohne daß die Genauigkeit der Reaktion darunter leidet. Wenn auch *Wassermann* (10) neuerdings als Erklärung hierfür die Theorie aufgestellt hat, daß das luetische Serum doch einen Ambozeptor, und zwar einen gegen Lipoide enthalte und sich dadurch vom normalen Serum unterscheide, so haben ihm doch viele andere Autoren die Behauptung entgegengestellt, daß es rein physikalisch-chemische Veränderungen sind, durch die sich das syphilitische Serum vom normalen unterscheidet. Mit der Nachprüfung dieser Behauptung beschäftigt sich der erste Teil der vorliegenden Arbeit.

I.

Von den Theorien dieser Art ist die am ausführlichsten entwickelte die von den Autoren als „elektrochemische“ bezeichnete, wie sie vor allem von *Epstein* (3) und *Paul*, von *Baumgaertel* (4) und *Kopaczewski* (5), in etwas anderer Form von *Mc. Donagh* (41) vertreten wird. Ihr liegt

die Vorstellung zugrunde, daß bei der *Wassermann*schen Reaktion das Komplement adsorbiert wird infolge der Dispersitätsvergröberung des Extraktkolloids. Bei den serodiagnostischen Reaktionen, die ohne Komplement arbeiten, soll diese Vergröberung entsprechend den anders gewählten Konzentrationen zur sichtbaren Flockung führen. Als Ursache der Vergröberung wird nun ein Ladungsausgleich entgegengesetzt geladener Kolloidteilchen angenommen. Die Lipoidteilchen des als Antigen verwendeten Extraktes sind gegenüber Wasser negativ geladen, wie *Epstein* (6) und *Paul* mit dem Kataphoreseversuch gezeigt haben. Wir konnten diese Tatsache durch eigene Versuche erhärten, wobei wir, wie weiter unten beschrieben werden wird, noch eine Fehlerquelle der *Epstein*schen Versuchsanordnung ausschalteten. Doch erscheint uns dieser Befund angesichts der Tatsache, daß die weitaus meisten Kolloide sich gegenüber Wasser negativ aufladen, in keiner Weise überraschend, und jedenfalls berechtigt er keineswegs zu dem von anderen Autoren gezogenen Schluß, daß die Koagulation bzw. Vergröberung dieses Sols bei der Luesreaktion nur dadurch erklärt werden kann, daß das luetische Serum Teilchen mit stärkerer positiver Ladung enthalten müsse als das normale Serum. Der experimentelle Beweis für diese letztere Behauptung ist nun zwar vielfach versucht worden, unseres Erachtens aber niemals geglückt. *Kopaczewski* (5) hat behauptet, durch einfache Kataphorese des Serums festgestellt zu haben, daß die Globuline des luetischen Serums zur Kathode, des normalen zur Anode wandern. *Baumgaertel* (4) will eine Wanderung zur Kathode gefunden haben, wenn er ein nach Vorschrift hergestelltes Gemisch aus Luesserum und Lipoidextrakt in den elektrischen Überführungsapparat brachte. Ähnliche Versuche hatte schon früher *Paul Schmidt* (7) angestellt, war aber in seinen Folgerungen nur so weit gegangen, eine Umladung der Extraktteilchen für *wahrscheinlich* zu halten. Er wie *Baumgaertel* berichten in den betreffenden Publikationen nichts darüber, ob sie Parallelversuche mit normalem Serum angestellt haben. Wir haben eine große Anzahl von Kataphoreseversuchen gemacht, zunächst genau nach der von *Kopaczewski* angegebenen Versuchsanordnung. Wir fanden im Gegensatz zu seiner Behauptung stets, daß die Globuline aus Luesserum[1]) in ihrer Hauptmasse zur Anode wandern, die aus normalem zum kleinen Teil auch zur Kathode, d. h. man kann von einem ausgesprochenen Wanderungssinn offenbar weder beim normalen noch beim luetischen Serum sprechen.

Bei der Nachprüfung der Versuche von *Schmidt* und *Baumgaertel* fanden wir nun allerdings auch zunächst eine überraschend starke kathodische Konvektion. Dieselbe war aber auch zu beobachten, wenn man statt luetischen Serums normales Serum verwendete. Damit schien uns bereits bewiesen, daß die Schlüsse *Baumgaertels* unberechtigt waren. Es ist aber auch ganz leicht zu erklären, wie dieses Phänomen zustande kommt. Wenn man nicht, wie es *Schmidt* getan hat, mit Globulinaufschwemmung in destilliertem Wasser arbeitet (und dann hat man ja wiederum physikalische Verhältnisse, die von denen bei der *Wassermann*schen Reaktion

---

[1]) Für die Überlassung stets frischer Sera sind wir Herrn Prof. *Bruhns* (Krankenhaus Kirchstraße), sowie Herrn Prof. *Umber* (Krankenhaus Westend) zu ganz besonderem Dank verpflichtet. Die als „negativ“ von uns verwendeten Fälle waren nicht seronegative Luetiker, sondern Gonorrhöen, Dermatitiden und innere Fälle, bei denen Lues auch klinisch ausgeschlossen war.

grundverschieden sind), so ist die Versuchslösung bei dem Kataphoreseversuch sehr viel elektrolytreicher (etwa n/7 NaCl) als eigentlich statthaft ist. Die Kataphorese wird dann gestört durch die eintretende Elektrolyse. Der Inhalt des U-Rohres wird sehr stark sauer, und das hat naturgemäß eine positive Aufladung der Eiweißkolloide zur Folge. Es gelang uns aber, diesem Übelstande abzuhelfen, indem wir zwischen den Zuleitungselektroden und den Schenkeln des U-Rohres eine Spülvorrichtung anbrachten, wie Abb. 1 sie verdeutlicht[1]). Dieselbe besteht beiderseits aus einem Glasgefäß, in das von unten dauernd neutrale n/7 Kochsalzlösung zutropft, während oben ein Abfluß angebracht ist. In dieses Spülgefäß tauchen nun zwei Agarröhrchen, von denen das eine zur Zuleitungselektrode, das andere in den Schenkel des U-Rohres führt. Die Tropfgeschwindigkeit braucht entsprechend der Ionenwanderungsgeschwindigkeit nur ganz gering zu sein. Der Widerstand, der durch diese Spülgefäße neu in den Stromkreis kommt, ist recht gering. Auf diese Weise gelingt es, das p_H in dem U-Rohre während der Kataphorese völlig konstant zu halten, wie wir durch vielfache elektrometrische Messungen vor und nach der Kataphorese beweisen konnten; die Resultate stimmten noch in der zweiten Dezimale genau überein. Ein in den Stromkreis eingeschaltetes Milliamperemeter zeigte während der ganzen Dauer der Kataphorese, die zwischen 3 und 24 Stunden fortgesetzt wurde, einen konstanten Strom von 9 Milliampere. Das ist die Versuchsanordnung, mit der wir auch die negative Wanderung der Lipoidteilchen einwandfrei feststellen konnten, ohne zu dem von *Epstein* herangezogenen Hilfsmittel der vorhergehenden Dialyse greifen zu müssen. Daß dieses Hilfsmittel nicht unbedenklich ist, erscheint ja klar, nachdem einwandfrei bewiesen ist, daß die Zuverlässigkeit der Luesreaktionen in hohem Maße von einem optimalen Elektrolytgehalt des Milieus abhängt [*H. Sachs* (34), *Guggenheimer* (32), *Neukirch* (33) u. a.]. Ein dialysierter Lipoidextrakt kann daher ebensowenig Gegenstand einer *exakten* Analyse des Mechanismus der Luesreaktionen sein wie etwa eine Globulinfraktion, die in destilliertem Wasser aufgeschwemmt ist. An dieser Tatsache ändert auch nichts die Angabe von *Epstein*, daß es gelingt, einwandfreie *Meinicke*-Reaktionen zu erhalten, wenn man ein solches dialysiertes Lipoidsol nachträglich wieder besalzt. Wir möchten an dieser Stelle ausdrücklich betonen, daß physikalisch-chemische Untersuchungen an den bei den Luesreaktionen verwendeten Substanzen nur dann Rück-

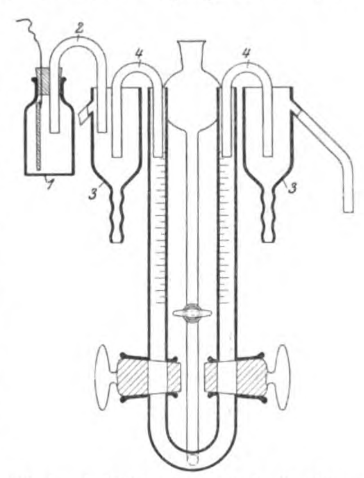


Abb. 1. 1. Zuleitungselektrode (Kupfer in gesättigter Kupfersulfatlösung). Klemmenspannung 120 Volt. Genau die gleiche Elektrode ist auf der andern Seite zu denken. 2. Glasröhrchen, gefüllt mit Agar-Agar, der in gesättigter Kupfersulfatlösung aufgelöst wurde. 3. Spülgefäß. Die unteren Enden stehen mittels eines T-stücks in Verbindung mit einem Standgefäß. 4. Wie 2, doch ist hier der Agar in physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst worden.

[1]) Für die Anfertigung der Zeichnungen bin ich Herrn *F. Reinicke* zu bestem Dank verpflichtet.

schlüsse auf den Mechanismus dieser Reaktionen gestatten, wenn diese Substanzen in *genau* dem gleichen Zustande der physiko-chemischen Prüfung wie der serologischen Reaktion unterworfen werden.

Sorgt man nun bei der *Baumgaertel*schen Versuchsanordnung auf die oben von uns beschriebene Weise für ein Konstantbleiben des p_H, so kann man auch hier nunmehr beobachten, daß der Hauptanteil des Eiweißes immer zur Anode wandert, gleichgültig, ob luetisches oder normales Serum verwendet wird. Auch in der Wanderungs*geschwindigkeit* besteht kein deutlicher Unterschied zwischen diesen beiden Fällen.

Immerhin wäre es noch denkbar gewesen, daß die aus dem Extrakt stammenden *Lipoid*teilchen eine verschiedene Wanderung zeigen, je nachdem, ob sie mit dem luetischen oder normalen Serum gemischt werden. Dies wäre theoretisch möglich, ohne daß die Hauptmenge des *Eiweißes* eine Ladungsverschiedenheit erkennen läßt. Wir versuchten deshalb, dieses Lipoid unabhängig vom Eiweiß in den Schenkeln des U-Rohres zu bestimmen. Es gelang nun durchaus nicht immer, so geringe Lipoidmengen neben einem großen Überschuß von Eiweiß nachzuweisen. Wir verwendeten als empfindlichstes Reagens auf Fette und Lipoide die Überosmiumsäure. Es konnte aber weder im Anoden- noch im Kathodenschenkel das ständige Fehlen oder Vorhandensein von Lipoid nachgewiesen werden.

Wir glauben, aus diesen Versuchen schließen zu können, daß *kein* einwandfreier Anhaltspunkt dafür besteht, daß in den luetischen Seren Teilchen mit stärkerer positiver Ladung vorhanden sind als in den nicht luetischen[1]), und daß die *Wassermann*sche Reaktion erklärt werden könnte durch einen Ladungsaustausch entgegengesetzt geladener Teilchen. Für die Auffassung *Baumgaertels*, daß im Luetikerserum eine positiv geladene Globulinlipoidverbindung den Reaktionskörper darstellt, fehlt jede experimentelle Stütze.

Von anderen Untersuchungen sei erwähnt, daß *Rondoni* (8) angibt, nach *Wassermann* positive Sera besäßen im allgemeinen einen höheren *polarimetrischen* Wert als negative. Eine Nachprüfung erübrigt sich wohl, da aus der veröffentlichten Tabelle des Autors selbst hervorgeht, daß die Schwankungsbreite der negativen Sera größer ist als die beobachtete Abweichung der positiven. Sehr genaue Untersuchungen mit dem von *Haber* und *Loewe* angegebenen Flüssigkeits*interferometer* haben *P. Hirsch* (9) und seine Mitarbeiter gemacht; auch sie geben an, keinen konstanten Unterschied zwischen luetischen und nicht luetischen Seren gefunden zu haben.

Wir haben nun eine große Zahl von Versuchen gemacht, um festzustellen, ob es *andere*, durch physikalisch-chemische Methoden nachweisbare Verschiedenheiten zwischen luetischen und nicht luetischen Seren gibt. Da diese Versuche sämtlich zu einem negativen Ergebnis führten, seien hier nur einige ganz kurz erwähnt. Wir haben die Fähigkeit der Sera, Farbstoffen gegenüber als Adsorbens zu wirken, geprüft, ebenso wie das Reduktionsvermögen der Sera gemessen, z. B. an der Fähigkeit, Goldchlorwasserstoffsäure zu Goldsolen zu reduzieren. Wir haben auch versucht, die sensibilisierende[2]) Einwirkung von Seren auf einfache bekannte

[1]) Mit den Beweisen, die *Skrop* (42) für diese Annahme beibringt, habe ich mich an anderer Stelle (43) ausführlich beschäftigt.

[2]) Es sei daran erinnert, daß „Sensibilisierung" im *kolloidchemischen* Sprachgebrauch soviel bedeutet wie eine Begünstigung der Elektrolytkoagulation durch Kolloide.

Kolloide zu studieren, wie auf Gold-, Eisen- und Vanadinpentoxydsole. In der Methodik dieser Versuche folgten wir im wesentlichen *Freundlich* und *Brossa* (22). Aber wir versuchten auch, den natürlichen Elektrolytgehalt des Serums als Koagulator zu benutzen, so daß wir — wogegen theoretisch keine Bedenken bestehen — Sensibilisator (Serumeiweiß) und Koagulator (Serumelektrolyt) gleichzeitig mit dem hydrophoben Sol vermischten und den Flockungswert im Reihenversuch ermittelten. Wir verzichten auf eine nähere Schilderung dieser Versuche; denn sie zeigten zwar sehr deutlich, daß das Serumeiweiß hydrophobe Sole (Gold-, Eisen- und V_2O_5) stark sensibilisiert, aber auch hierbei zeigte sich kein konstanter Unterschied zwischen normalen und luetischen Seren.

II.

Da es mit allen diesen Methoden sich als unmöglich herausstellte, das luetische Serum physikalisch-chemisch gegenüber dem normalen Serum zu charakterisieren, so blieb nur der eine Weg übrig, die Sera nicht in ihrer Gesamtheit, sondern ihre einzelnen Eiweißfraktionen[1]) zur Untersuchung heranzuziehen. Zwei Gründe sprechen noch besonders für dieses Vorgehen. Nach den Untersuchungen von *Reitstoetter* (12) bestand ja einerseits sehr wohl die Möglichkeit, daß die zahlenmäßig überwiegenden Albumine auch im luetischen Serum, wie bei den von *Reitstoetter* untersuchten antitoxischen, uncharakteristisch sind[2]) und eine charakteristische Veränderung der Globuline verdecken. Andererseits sind in der Literatur eine ungewöhnlich große Zahl von Arbeiten vorhanden, die die Rolle der verschiedenen Eiweißfraktionen bei der Wassermannreaktion behandeln, und ebensooft die Albumine wie die Globuline als Träger der Reaktion bezeichnen. Diese äußerst widerspruchsvollen Resultate reizten zu einer Nachprüfung.

Wenn man die große Empfindlichkeit dieser Eiweißkörper einerseits und die sehr groben Methoden, die bisher nur für ihre Trennung zur Verfügung standen, andererseits bedenkt, so schien eine Klärung nur dann möglich, wenn es gelang, eine Fraktionierung zu ermöglichen, ohne die einzelnen Fraktionen in ihrer Struktur eingreifend zu verändern.

Die Schwierigkeiten, die der Erreichung dieses Zieles entgegenstehen, sind kürzlich erst von *Oeller* und *Schierge* (38) nachdrücklich betont worden. Aber diese Schwierigkeiten scheinen uns nicht unüberwindlich zu sein, wenn wir auch mit den genannten Autoren *darin* völlig übereinstimmen, daß *bisher* einer bestimmten Eiweißfraktion die komplementbildende Wirkung nicht mit völlig gesicherten Beweisen

[1]) Daß der Reaktionskörper des luetischen Serums einer solchen angehört und nicht ein Lipoid ist, wird jetzt auch von *Wassermann* (10) angenommen und ist kürzlich erst von *Otto* (11) durch einen eleganten Versuch bewiesen worden.

[2]) Diese unsere Vermutung hat sich, wie wir unten sehen werden, vollauf bestätigt.

zugesprochen werden konnte. Auch ihrer Kritik der bisher üblichen Fraktionierungsmethoden schließen wir uns durchaus an, wie weiter unten dargetan werden soll.

Die Nomenklatur auf diesem Gebiete ist recht verworren. Im allgemeinen unterscheidet man wohl aber mit *Hofmeister* im wesentlichen drei Eiweißfraktionen des Serums: Albumine, Pseudoglobuline und Euglobuline. Nur die letzteren sind verhältnismäßig gut charakterisiert durch die Tatsache, daß sie in reinem Wasser unlöslich sind, daher beim Dialysieren und sehr intensiven Verdünnen des Serums mit destilliertem Wasser ausfallen. Hingegen sind die Pseudoglobuline von den Albuminen technisch wie begrifflich eigentlich nur dadurch zu trennen, daß sie bereits ausfallen, wenn man das Serum mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt, während die Albuminfraktion nur dadurch auszusalzen ist, daß man das Serum selbst mit festem Ammonsulfat sättigt. Es liegt auf der Hand, daß diese Unterscheidung eine recht willkürliche ist. Deshalb war das nächste Ziel die quantitative Erfassung der verhältnismäßig gut definierten Euglobuline. Zu ihrer Darstellung bedienten sich bisher die Autoren der Sättigung des Serums mit CO_2, der Fällung mit Ammonsulfat, Magnesiumsulfat, Salzsäure, Essigsäure und anderen Säuren, sowie der Dialyse. Gegen die drei ersten Methoden, die in zahllosen Varianten ausgearbeitet sind, sprechen zwei schwere Bedenken. Erstens ist ein Hinzufügen von serumfremden Ionen bzw. gar von Säuren sicherlich keine schonende Behandlung der Eiweißkörper; zweitens besteht bei ihnen durchaus nicht die Gewähr, daß man auf diese Weise die gesamte Euglobulinfraktion im Sinne obiger Definition zur Ausflockung bringt. Wir werden sogar später zeigen können, daß gerade dies einer der Hauptgründe ist, warum die Angaben der verschiedenen Autoren über die Bedeutung der Albumine und Globuline für die *Wassermann*sche Reaktion bis in die jüngste Zeit so diametral entgegengesetzt lauten. Bei der Trennung durch Dialysieren scheint diese Gefahr nicht zu bestehen. Das Dialysieren muß man aber sehr lange Zeit fortsetzen, um wirklich alle Euglobuline aus dem Serum auszuflocken. Dabei ist nun, wie schon *Reitstoetter* ausführlich dargelegt hat, die Aussicht, die auf diese Weise getrennte Fraktion auch nur annähernd in demselben Zustande zu erhalten wie in vivo, sehr gering. Wir wandten deshalb eine Apparatur an, wie sie *Ruppel, Ornstein, Carl* und *Lasch* (37) in allerjüngster Zeit angegeben haben, um das Serum seines gesamten Elektrolytgehaltes zu berauben. Ihre Beschreibung beschränkt sich im wesentlichen auf die in der Patentliteratur niedergelegten Erfahrungen und gibt zur Ausübung der Methode keine ausreichende Erläuterung. Aus Abb. 2 wird das Wesen des von uns verwendeten Dreizellenapparates verständlich. Wir möchten ergänzend hierzu bemerken, daß es sich uns als unumgänglich notwendig herausgestellt hat, als Anode ein Platindrahtnetz zu verwenden, da sonst sekundäre Strömungen und Zersetzungen auftreten. Als Kathode genügt aber ein Messingdrahtnetz. Als Diaphragma auf der Kathodenseite verwendeten wir reines Pergamentpapier von *Schleicher & Schüll*. Ein entsprechend stark positives Diaphragma für die Anodenseite zu finden, ist nicht ganz einfach. *Ruppel* und Mitarbeiter empfehlen als solches „tierische Blase“, mit der (z. B. Amnionhäutchen, mit denen auch *Kapsenberg* gearbeitet hat) ich aber keine günstigen Erfahrungen machte. Am besten bewährte sich uns die Verwendung von chromierter Gelatine, die wir auf Grund der Versuche

von *Bethe* (13) und *Toropoff* sowie von *A. Riekmann* (39) heranzogen. Die Herstellung dieses Diaphragmas ist einfach. Eine dünne, aus reiner Wolle bestehende Membran wird beiderseitig mit einer heißen Lösung von etwa 10 g Gelatine, 3 g Ammoniumbichromat und 5 g Glycerin in 100 ccm destilliertem Wasser bestrichen und einen Tag lang möglichst intensiver Belichtung ausgesetzt. Dieser Vorgang wird noch zweimal wiederholt, dann ist die Membran gebrauchsfertig. Wir legten eine Spannung von 120 bis 240 Volt an. Durch einen in den Stromkreis eingeschalteten Rheostaten muß man dafür sorgen, daß zu Beginn der Elektrolyse, wenn die Leitfähigkeit der Zelle noch sehr groß ist, die Stromstärke[1]) nicht über etwa 2 Amp. hinausgeht, da sonst die Temperatur des Serums, die fortlaufend beobachtet werden muß, 37° übersteigen kann. — *Reitstoetter* hat schon darauf hingewiesen, daß bei nicht sorgfältig ausgewählten Diaphragmen die Gefahr besteht, daß der Inhalt der Mittelzelle, in unserem Falle also das Serum, sauer oder alkalisch

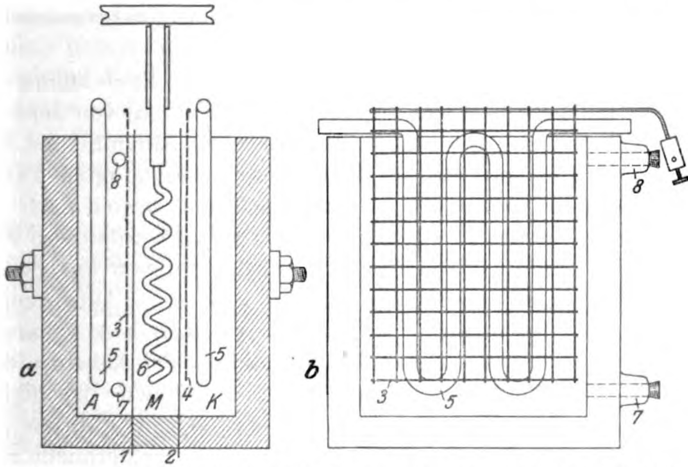


Abb. 2 u. 3. 3-Zellenapparat zur elektrolytischen Reinigung des Serums. a) Querschnitt. b) Ansicht der Anodenzelle nach Auseinandernahme des Apparats. *M* Mittelzelle, zur Aufnahme des Serums, *A* Anodenraum, *K* Kathodenraum, 1 Chromgelatinemembran, 2 Pergamentmembran, 3 Platindrahtnetz, 4 Messingdrahtnetz, 5 Kühlschlange, 6 Rührvorrichtung, 7 Zuflußvorrichtung für destilliertes Wasser, 8 Abflußvorrichtung für destilliertes Wasser.

werden kann. — Wir fanden diese seine Behauptung vollauf bestätigt, wenn wir zwei gleiche Diaphragmen benutzten[2]). Bei Anwendung der beiden oben beschriebenen Diaphragmen waren die Änderungen des p_H während der Elektrolyse in der Mittelzelle recht gering. Es gelang uns, sie praktisch auf Null herabzusetzen dadurch, daß wir einen korkenzieherartig gewundenen

[1]) Die Reproduzierbarkeit dieser elektrolytischen Versuche erfordert es, daß man mit einem empfindlichen Amperemeter im Stromkreis und einem Voltmeter im Nebenschluß dauernd Spannung und Stromstärke abliest und registriert.

[2]) Gegenüber den Angaben von *Pauli* (14) müssen wir ausdrücklich darauf hinweisen, daß bei Verwendung von Pergamentdiaphragmen auf *beiden* Seiten der Mittelzelle die $(H^{\cdot})$ in der Mittelzelle ganz erheblich ansteigt, wovon wir uns durch genaue Messungen wiederholt überzeugen konnten.

Glasstab, der von einem Motor gedreht wurde, in der Mittelzelle kräftig rühren ließen. Unter diesen Vorsichtsmaßregeln reagierte das Serum während und nach der Elektrolyse gegen Lakmus neutral. Die elektrometrische Bestimmung des p_H ergab nach zu Ende geführter Elektrolyse Werte, die *ganz schwach* sauer waren, was offenbar durch das Ausfallen der Euglobuline verursacht war. Auch *Ruppel* (37) und Mitarbeiter fanden in diesem Zeitpunkt $p_H = 6{,}4$. Daß *sämtliche* Elektrolyte aus dem Serum abgewandert sind, erkennt man daraus, daß im Anodenraum mit Silbernitrat keine Chlorionen mehr nachweisbar sind, und daß die Stromstärke nicht mehr größer ist, als wenn man das Serum durch destilliertes Wasser ersetzt. Erst dann hat man auch die Gewähr, daß *sämtliche* Euglobuline ausgeflockt sind. Die ganze Prozedur dauerte je nach der vorhergehenden Verdünnung (im allgemeinen fünf- bis zehnfach) des Serums mit destilliertem Wasser 10 bis 40 Minuten, stellt also einen sehr kurzen und, da keinerlei Zufügungen serumfremder Substanzen (wie Ammonsulfat, Salzsäure oder Überschuß von CO_2) stattfindet, auch einen zweifellos sehr behutsamen Eingriff dar.

Die infolge der Elektrolyse ausgeflockten Euglobuline werden durch einstündiges Zentrifugieren (etwa 2500 Touren) von dem übrigen Serum getrennt: Dieses enthält also nur noch Albumin und Pseudoglobulin und gibt, wie aus den anhangsweise beigefügten Tabellen I bis VI hervorgeht, *immer* eine *negative* Reaktion, sowohl nach *Wassermann* wie nach *Sachs-Georgi*. (Selbstverständlich wurde diese Fraktion vor der serologischen Prüfung durch Hinzufügen von analysenreinem NaCl auf physiologischen Kochsalzgehalt gebracht. Außerdem wurde von jeder Fraktion gleichzeitig mit der serologischen Untersuchung das p_H elektrometrisch bestimmt. Die Protokolle des Anhangs, die auch von diesen Messungen natürlich nur einen kleinen Bruchteil einer großen Zahl gleicher Resultate wiedergeben, zeigen, daß das p_H aller Fraktionen in physiologischer Breite lag und als Fehlerquelle nirgends in Betracht kommen kann.) Die serologischen Untersuchungen[1]) wurden an Fraktionen angestellt, die aus aktiven und inaktiven Seren stammten; gelegentlich wurden auch die Fraktionen aus aktiven Seren nachträglich inaktiviert. Das serologische Resultat war bei allen diesen Modifikationen (das gilt auch für die unten besprochenen Euglobulinprüfungen) genau das gleiche[2]). An diesem Ergebnis ändert sich auch

[1]) Die serologischen Untersuchungen wurden in der serodiagnostischen Abteilung der Universitätshautklinik in Breslau angestellt, wohin die Proben unmittelbar nach der Fraktionierung durch Eilbriefe geschickt wurden. Eine Probe des ursprünglichen Serums lief zur Kontrolle mit. Wir möchten auch an dieser Stelle Herrn Geh. Rat *Jadassohn* und Fräulein *Margarete Stern*, der Leiterin der Serologischen Abteilung, unseren besonderen Dank für ihre stete Hilfsbereitschaft bei den oft sehr mühsamen Untersuchungen wiederholt aussprechen.

[2]) Hier weichen unsere Resultate also von denen von *Oeller-Schierge* (38) ab, die ja aber auch mit den von ihnen selbst als unzulänglich bezeichneten Trennungsmethoden ihre Versuche angestellt haben.

nichts, wenn man durch Ammonsulfatfällung die Pseudoglobuline von den Albuminen trennt und beide getrennt untersucht[1]) (s. Tabellen I und II). Damit war die hauptsächlich von *Weissbach* (15), *Kapsenberg* (16), *Forssmann* (30), *Harold* (40), *Sachs* (47) und *Ruppel* nebst Mitarbeitern (37) vertretene Ansicht, daß *nur* die Euglobulinfraktion im Luetikerserum verändert ist, sehr wahrscheinlich geworden. Um sie aber mit Sicherheit zu stützen, mußten die auf diese Weise gewonnenen Euglobuline wieder peptisiert und der *Wassermann*schen Reaktion unterworfen werden. Dieses experimentum crucis ist den eben genannten Autoren nicht einwandfrei geglückt. Wohl gaben z. B. *Kapsenbergs* Euglobuline eine positive *Wassermann*sche Reaktion, aber oft auch dann, wenn sie aus einem einwandfrei nicht luetischen Serum gewonnen waren[2]). Den Grund hierfür glauben wir gefunden zu haben. In der Literatur findet man immer wieder die Angabe, daß gefällte Euglobuline durch physiologische Kochsalzlösung leicht peptisierbar sind. Wir können diese Angabe nicht bestätigen und möchten glauben, daß sie nur zutreffend ist für einen kleinen Teil der Euglobuline, wie er durch die oben erwähnten Verfahren lediglich gefällt wird.

---

[1]) Die gefällten Pseudoglobuline wurden in destilliertem Wasser gelöst und durch Elektrolyse gereinigt. Dabei zeigte sich aber, daß trotz unserer oben beschriebenen Vorsichtsmaßnahmen die Fraktion stets sauer wurde, wenn wir sie durch die Elektrolyse von dem anhaftenden Ammonsulfat befreien wollten. Offenbar ist das zweiwertige Sulfation in dieser Hinsicht gefährlicher als die einwertigen Anionen, die bei der Elektrolyse des nativen Serums keine Störung verursachten. Deshalb versetzten wir die ammonsulfathaltige Pseudoglobulinfraktion mit genau der im Reihenversuch ermittelten Menge von Bariumacetat, die notwendig ist, um alles Sulfat auszufällen, ohne einen Überschuß von Bariumionen zurückzulassen. Man bekommt dann einen leicht abzuzentrifugierenden Niederschlag von Bariumsulfat und eine Ammoniumacetatlösung des Pseudoglobulins, die sich durch Elektrolyse elektrolytfrei machen läßt, ohne daß sich ihr p_H ändert. Unser Kunstgriff beruht also darauf, das Anion einer starken Säure (SO_4'') durch das einer schwachen (CH_3COO') zu ersetzen, wobei die Wahl des Kations $Ba^{\cdot\cdot}$ durch die minimale Löslichkeit von $BaSO_4$ in Wasser gegeben erschien. Das ausfallende Bariumsulfat adsorbiert keine meßbaren Mengen von Pseudoglobulin, wovon wir uns natürlich wiederholt überzeugten. Auf diese Weise erhielten wir völlig einwandfreie Pseudoglobulinfraktionen, die nun auf physiologischen Salzgehalt gebracht und der *Wassermann*schen Reaktion unterworfen wurden. Sie reagierten — wie schon oben erwähnt — ausnahmslos negativ, gleichgültig, ob sie aus luetischem oder nicht luetischem Serum stammten.

[2]) *Weisbach* hat seine durch vieltägige Dialyse gewonnenen Euglobuline leider nicht *isoliert* der *Wassermann*schen Reaktion unterworfen; wohl aber hat er bereits ihr spezifisches Verhalten festgestellt, wenn er die Globuline eines normalen und eines luetischen Serums austauschte. *Ruppel, Ornstein, Carl* und *Lasch* berichten über solche Kontrollversuche gar nichts.

Die *gesamte* Euglobulinfraktion, wie sie definitionsgemäß nur aus *völlig* elektrolytfreien Seren ausfällt, peptisiert sich in physiologischer Kochsalzlösung sehr schlecht. Wir glauben, daß in einer solchen nicht entfernt der hohe Dispersitätsgrad erreicht wird, wie er zweifellos im ursprünglichen Serum vorliegt. Mit solchen Kochsalzeuglobulinen, die übrigens auch nach kurzer Zeit im Eisschrank von selbst ausflocken, erhielten auch wir unspezifische Hemmungen bei der *Wassermann*schen Reaktion.

Um diesem Übelstande zu begegnen, benutzten wir als Dispersionsmittel Lösungen von *Normosal*, einem Präparat der Sächsischen Serumwerke, das im wesentlichen alle anorganischen Bestandteile des Serums im richtigen Mischungsverhältnis enthält und daher auch die Eigenschaften eines Puffers besitzt, dessen p_H bei den einzelnen Chargen nur zwischen 7,0 und 7,6 schwankt, wovon wir uns durch elektrometrische Messungen jedesmal überzeugten. (Selbstverständlich stellten wir in Voruntersuchungen fest, daß das Normosal *allein* ohne jeden Einfluß auf den Ausfall der *Wassermann*schen und *Sachs-Georgi*-Reaktion ist.) Die abzentrifugierten Euglobuline wurden nun mit destilliertem Wasser gründlich gewaschen und dann mit genau der Menge Normosallösung peptisiert, die der Menge des Serums, aus dem sie gewonnen waren, gleich war. In der Tat gelang es nun auf diese Weise, einen charakteristischen Unterschied zwischen normalen und luetischen Euglobulinen festzustellen. Wir haben auf diese Weise 60 Sera untersucht, 40 luetische und 20 sicher nicht luetische. In allen diesen Fällen stimmten die *Wassermann*sche Reaktion und *Sachs-Georgi* der so behandelten Euglobuline[1]) mit der des ursprünglichen Serums überein, wofür wir im Anhang einige Protokolle (Tabellen I bis VI) als Beleg anführen werden[2]). Da in *allen* diesen Fällen die Albumin-Pseudoglobulinfraktionen negativ reagierten (um ganz gleiche Versuchsbedingungen zu haben, wurden späterhin auch die Albuminfraktionen nicht mit NaCl, sondern mit der entsprechenden Menge von festem Normosal besalzen), schien uns der endgültige Beweis erbracht, daß *nur* die Euglobuline die für die *Wassermann*sche Reaktion maßgebende Veränderung erfahren haben.

---

[1]) Das scharf spezifische Verhalten der Euglobuline (sofern man sie nur mit einem geeigneten Dispersionsmittel peptisiert) spricht meines Erachtens *gegen* die Auffassung *Ruppels* (29), „daß das Euglobulin im Serum nicht in freiem Zustande existiert, sondern erst im isoelektrischen Punkte abgespalten wird".

[2]) In der *Menge* der ausgeflockten Euglobuline bestand kein konstanter Unterschied zwischen luetischen und nicht luetischen Seren, wie wir gegenüber anders lautenden Angaben einiger Autoren ausdrücklich hervorheben möchten.

Die gegenteilige Ansicht *Sahlmanns* (10) hatte aber doch so viel Gewicht für uns, daß wir noch eine Ergänzungsprüfung anstellten. Wir hielten uns dabei genau an das von ihm angewendete Verfahren der CO_2-Fällung, obwohl wir, wie schon oben erwähnt, nachweisen konnten, daß diese Fällung unvollständig ist. Unterwirft man nämlich ein durch CO_2-Einleiten von Euglobulinen angeblich befreites Serum der Elektrolyse, so fallen fast noch ebensoviel Euglobuline aus, wie vorher bei der CO_2-Fällung. Parallel zu diesen CO_2-Globulinen untersuchten wir denjenigen Anteil der Euglobuline, der lediglich durch Verdünnen des Serums mit der fünffachen Menge destillierten Wassers und scharfes Zentrifugieren (2 Stunden 3000 Touren) erhalten werden kann. Auch die durch diese Methoden gewonnenen Globuline wurden mit Normosal peptisiert und mit ihnen die *Wassermann*sche Reaktion angestellt; sie zeigten bei der *Wassermann*schen Reaktion nicht ganz klare Verhältnisse (vgl. Protokoll, Tabellen III und VI). Es traten ganz ungewöhnlich starke Eigenhemmungen auf. Bei den dadurch notwendig gewordenen Verdünnungen (bisweilen $^1/_{1000}$ bis $^1/_{3000}$) erhielten wir aus negativem Serum zwar eine negative, aus positivem aber nicht immer eine deutlich positive Reaktion. Es ergab sich, daß die durch einfaches Verdünnen und Zentrifugieren gewonnenen Globulinfraktionen — mindestens quoad *Wassermanns* und *Sachs-Georgis* Reaktion — identisch zu sein scheinen mit den CO_2-Globulinen. Wir schlagen für diese Fraktion den Namen *Labilglobuline* vor, da sie offenbar dadurch charakterisiert sind, daß sie schon durch unvollständige Entfernung der Elektrolyte gefällt werden können. Für den Ausfall der *Wassermann*schen Reaktion kann diese Fraktion jedenfalls nicht maßgebend sein, denn nach ihrer Entfernung bleiben positive Sera stets positiv. Wurden sie nun aber der Elektrolyse unterworfen und dadurch vollständig elektrolytfrei gemacht, so hatten sie mit den nunmehr ausgefallenen Euglobulinen — denn diesen Namen möchten wir reserviert wissen für die nur bei *völliger* Elektrolytfreiheit des Serums ausfallenden Globuline — auch ihre positive Reaktion verloren, während die Euglobuline genau so stark positiv reagierten, wie wenn man das *ursprüngliche* Serum elektrolysiert und dadurch Labilglobuline plus Euglobuline erhält.

Mit den *tatsächlichen* Befunden *Sahlmanns* an CO_2-Globulinen stehen unsere Ergebnisse also nicht im Widerspruch. Nur die Annahme *Sahlmanns*, daß die *Pseudo*globuline mit als Träger der *Wassermann*schen Reaktion in Betracht zu ziehen seien, erscheint uns falsch und auf dem Irrtum beruhend, als könne man durch CO_2 die *gesamten Euglobuline* fällen, während doch tatsächlich die *eigentlichen* Euglobuline bei diesem Verfahren in Lösung bleiben. Auch *Gloor* (18) und *Klinger*,

sowie *Mandelbaum* (19)[1]) haben, worauf schon *Kapsenberg* (16) hinweist, ungenügende Fällungsmethoden angewendet, die ihre Resultate durchaus erklären.

Auf Grund der obigen Versuche kann ich mich der Ansicht *Ruppels* (37) und seiner Mitarbeiter, die für die Eigenhemmung die gleiche Fraktion verantwortlich machen wie für die echte Komplementbindung, nicht anschließen. Hingegen bestätigt meine Unterscheidung zwischen Labilglobulinen und Euglobulinen eine ältere und neuerdings wieder aufgegriffene (49) Arbeit von *H. Sachs* (20). In ihr hat er sogar empfohlen, in Fällen, wo das Gesamtserum starke Eigenhemmung zeigt, „durch den Kunstgriff einer partiellen Globulinfällung zu einwandfreien Versuchsbedingungen zu gelangen". Diese Möglichkeit scheint nach unseren Versuchen durchaus gegeben. Nur muß man die Sicherheit haben, wirklich nur die Labilglobuline auszufällen und die übrigen Eiweißkörper möglichst unversehrt zu behalten. Aus diesem Grunde scheint uns die Salzsäure, die *Sachs* als Fällungsmittel benutzt, bedenklicher als die von uns benutzten Methoden zur Entfernung der Labilglobuline.

Jedenfalls erscheint uns sichergestellt, daß die wesentliche Veränderung des luetischen Serums *nur* in der Euglobulinfraktion zu suchen ist[2]), und zwar in jenen weniger labilen Anteilen der Fraktion, auf den wir den Namen Euglobuline allein anwenden möchten.

III.

Nachdem das gestellte Problem in dieser Weise eingeengt war, konnte erneut versucht werden, ob die auf diese Weise isolierte und spezifisch reagierende Euglobulinfraktion physikalisch-chemische Besonderheiten gegenüber der aus normalem Serum aufwies. Leider kommen für die Untersuchungen Methoden wie die Gold- und Eisenzahluntersuchungen[3]) *nicht* in Betracht. Der hohe Elektrolytgehalt, den, wie oben erörtert, Euglobulinlösungen zwangsläufig haben (etwa n/7 Kochsalz, sowie, wenn auch in geringerer Menge, zwei- bis dreiwertige Kationen), macht es unmöglich, derartige kolloidchemische Untersuchungen anzustellen.

---

[1]) Auch die Resultate von *Mackie* (44), *Renaux* (45) und *Tannenberg* (46) finden ihre Erklärung durch die Mängel der CO_2-Fällung.

[2]) Wir möchten ausdrücklich betonen, daß diese Feststellung noch nichts über die Art dieser Veränderung aussagt. Die Euglobuline *könnten* die Träger des von *Wassermann* angenommenen Ambozeptors gegen Lipoide sein. Sie könnten theoretisch auch noch eine durch Äther extrahierbare „*Wassermann*-Substanz" (z. B. adsorbiert?) enthalten, wie *Forssmann* (30) sie annahm, der aber später selbst diese seine Folgerung als nicht stichhaltig bezeichnete.

[3]) Bezüglich der Erläuterung dieser Methoden kann hier nur auf die Arbeiten von *Zsigmondy* (21) und *Freundlich-Brossa* (22) bzw. *Windisch* und *Bermann* (23) verwiesen werden.

Auch die Kataphorese gestaltete sich aus diesem Grunde schwierig. Selbst nach 12- bis 24stündiger Einwirkung des elektrischen Stromes konnte man makroskopisch keine deutliche Verschiebung der durch ihre Trübung gekennzeichneten Globuline wahrnehmen. Um festzustellen, ob überhaupt eine, wenn auch jedenfalls sehr geringfügige Wanderung der Eiweißteilchen stattgefunden hatte, wurden nach Schluß der beiden Hähne die beiden Schenkelflüssigkeiten herauspipettiert und je mit 1 ccm 20proz. Sulfosalicylsäure versetzt. Durch dieses außerordentlich empfindliche Reagens gelang es in der Tat, nachzuweisen, daß regelmäßig etwas Eiweiß in den Kathodenschenkel gewandert war. Es zeigte sich aber hierbei *keinerlei* Unterschied in dem Verhalten der serologisch positiv und negativ reagierenden Euglobuline, weder im Wanderungssinne, noch in der Wanderungsgeschwindigkeit. Es ist wichtig zu betonen, daß *hier zum erstenmal* eine Eiweißfraktion der Kataphorese genau in *dem* Zustande unterworfen wurde, in dem sie nach *Wassermann* und *Sachs-Georgi* spezifisch reagiert. Deshalb möchten wir, obgleich wir so die bisher unbewiesene Vermutung von *P. Schmidt* und *Epstein* bestätigt haben, daß nämlich die Euglobuline (ganz allgemein) in der Tat eine positive elektrische Ladung tragen, es doch für unwahrscheinlich halten, daß die serodiagnostische Reaktion lediglich durch eine stärker positive Ladung im Luetikerserum erklärt werden könnte[1]).

Damit ist aber noch nicht bewiesen, daß die Fähigkeit der *luetischen* Euglobuline, mit Lipoidsolen so zu reagieren, daß eine Bindung des Komplements bei der *Wassermann*schen Reaktion, eine Flockung bei den anderen serodiagnostischen Reaktionen die Folge ist, nur durch Annahme eines spezifischen Ambozeptors gegen Lipoide erklärt werden kann. Zweifellos liegt es mindestens bei den Flockungsreaktionen (und daß die *Wassermann*sche Reaktion nur ein früheres Stadium eines im Wesen von diesen nicht verschiedenen Vorganges darstellt, darüber sind fast alle Autoren einig) näher, an eine kolloidchemische Reaktion zu denken. Die Dispersitätsvergröberung eines Sols bzw. seine gesteigerte Elektrolytempfindlichkeit[2]) kann nun aber in der Tat durch andere Einflüsse bewirkt werden als durch den elektrischen Ladungsausgleich der Teilchen, den wir bei den serologischen Luesreaktionen ablehnen zu müssen glauben. *Kruyt* (24) hat kürzlich darauf aufmerksam

[1]) Wir kommen also ebenso wie *Bauer* und *Nyiri* (48) zur Ablehnung der „elektrochemischen“ Theorie, möchten aber bemerken, daß wir die Beweisführung dieser Autoren nicht für schlüssig ansehen können.

[2]) Es sei nochmals daran erinnert, daß alle serologischen Luesreaktionen *nur* im elektrolythaltigen Medium vonstatten gehen, und daß eine Sensibilisierung auch bei *nachträglichem* Zusatz des sensibilisierenden Kolloids eintreten kann.

gemacht, daß das *Tannin* in hervorragendem Maße die Fähigkeit besitzt, zu sensibilisieren, auch in Fällen, bei denen man nicht mit einem Ladungsausgleich rechnen konnte. *Kruyt* hat eine Theorie entwickelt, derzufolge der polare Bau des Tanninmoleküls die Ursache für seine Fähigkeit ist, hydrophile Sole hydrophober zu machen (zu dehydratisieren), und sie so zu sensibilisieren bzw. zu koagulieren. *Freundlich* (25) und *Brossa* haben den sensibilisierenden Einfluß des Tannins auf Farbstoffsole eingehend untersucht und gefunden, daß er in gleicher Weise gegenüber positiv wie negativ geladenen Solen in Erscheinung tritt, also kaum auf einer elektrischen Entladung beruhen kann. Dieselbe Fähigkeit fanden sie nun auch bei Verwendung von tierischen Globulinen. Auf Grund dieses Parallelismus erschien es uns denkbar, daß das luetische Euglobulin, im Gegensatz zum normalen, eine der Sensibilisierung durch Tannin ähnliche Wirkung auf die Lipoidsole, die als Antigen verwendet werden, auszuüben vermag. Es lag daher nahe zu versuchen, ob die spezifische Wirkung des luetischen Euglobulins durch Tannin ersetzt werden kann. Um diese Vermutung nachzuprüfen, versetzten wir einwandfrei negative Sera mit variiert konzentrierten Lösungen von reinem *Merck*schen Tannin in physiologischer Kochsalzlösung, und in der Tat gelang es auf diese Weise, wie die Protokolle (Tabellen VII und VIII) zeigen, bei einer optimalen Tanninkonzentration (optimal ist die Konzentration, wenn man das Serum mit der doppelten Menge einer 0,1 proz. Tanninlösung versetzt) mit normalen Seren eine positive Reaktion nach *Wassermann* und *Sachs-Georgi* zu erzielen. (Allerdings gelingt dies bei der *Wassermann*schen Reaktion nur dann, wenn man die Sera aktiv verwendet. Die durch das Inaktivieren erzielte Stabilisierung führt ja allgemein zu einem schwächeren Reagieren der Sera. Immerhin ist es auffallend, daß die Tanninwirkung dabei vollkommen hintangehalten wird.) Die Voraussetzung für saubere Resultate ist, daß man die Reaktion unmittelbar nach dem Tanninzusatz ansetzt[1]), da nach einiger Zeit chemische Umsetzungen zwischen Tannin und Eiweiß erfolgen. — Die starken Eigenhemmungen, die meistens bei den Gemischen von normalem Serum und Tannin auftreten, waren die Hauptveranlassung, die Wirkung des Tannins *ohne* Serumzusatz bei der *Wassermann*schen Reaktion und der nach *Sachs-Georgi* zu prüfen. In vielfach wiederholten Versuchen zeigte sich, daß eine Tanninlösung von geeigneter Konzentration (eine 0,1 proz. Tanninlösung verhält sich etwa wie ein 1 : 1 ver-

[1]) Diese Versuche mußte ich deshalb in der Breslauer Hautklinik an Ort und Stelle vornehmen. Auch an dieser Stelle danke ich Herrn Geheimrat *Jadassohn* für die große Freundlichkeit, mit der er sein Laboratorium hierzu zur Verfügung gestellt hat, und ganz besonders Fräulein *Margarete Stern* für ihre verständnisvolle Mitarbeit.

dünntes luetisches Serum) durchaus imstande ist, das luetische Serum beim Zustandekommen der positiven *Wassermann*schen Reaktion und der nach *Sachs-Georgi* zu *ersetzen* (Protokoll, Tabelle IX). Dieser Befund paßte durchaus zu unserer Vorstellung, daß das luetische Euglobulin *ebenso* wie Tannin, das dann natürlich auch *ohne* Serumzusatz eine positive Reaktion ergeben muß, dehydratisierend und dadurch koagulierend auf die Lipoidsole, die als Antigen verwendet werden, wirkt.

Hier sei an die Versuche erinnert, die in jüngster Zeit *W. Bachmann* (26) mit Aminosäuren und Chloralhydrat angestellt hat. Er hat gefunden, daß es durch Zusatz von Glykokoll gelingt, ein negatives Serum positiv zu machen. Ob Glykokoll allein auch schon eine positive Reaktion verursacht, hat er offenbar nicht untersucht. Jedenfalls nimmt er hierbei, wie bei den von ihm beobachteten, nicht ganz eindeutigen Änderungen im Ausfall der *Wassermann*schen Reaktion beim Zusatz von Chloralhydratlösungen als Ursache eine Verschiebung des p_H nach der sauren Seite hin an. Da nun auch das Tannin eine schwache Säure ist (eine 0,1proz. Tanninlösung in physiologischer Kochsalzlösung ergab bei der elektrometrischen Messung $p_H = 3,783$), so mußte auch bei unseren Versuchen die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß mindestens die positive *Wassermann*sche Reaktion lediglich auf einer Hämolysehemmung infolge zu großer H-Ionenkonzentration beruhen könne. *Sachs* (27) und seine Mitarbeiter haben ja gezeigt, daß man durch Hinzufügen von Säure oder Alkali die *Wassermann*sche Reaktion unspezifisch gestalten könne. Exakte Angaben stammen von *L. Michaelis* (28), der nachgewiesen hat, daß bei einem p_H von etwa 5,8 die Hämolyse ausbleibt, weil das Komplement unwirksam ist. Dieser Tatsache hatten wir ja auch bei der Prüfung der verschiedenen Eiweißfraktionen so weitgehend Rechnung getragen, wie dies unseres Wissens in früheren Arbeiten noch nie geschehen ist. Nun konnten wir allerdings durch elektrometrische Messungen zeigen, daß in den von uns verwendeten Gemischen von normalem Serum und Tannin das p_H stets um 7,0 herum lag; offenbar genügte die Pufferwirkung des Serums auch in vitro noch, um die Wirkung einer so schwachen Säure, wie es das Tannin ist, auszugleichen. Da wir aber auch das Tannin *ohne* Serumzusatz verwendeten, mußten wir dafür sorgen, daß seine Lösung keine größere H-Ionenkonzentration aufwies, als sie mit der Wirkung des Komplements verträglich ist. Zu diesem Zwecke lösten wir das Tannin statt in physiologischer Kochsalzlösung wiederum in Normosallösung, von der wir schon bei ihrer Verwendung als Lösungsmittel für Euglobuline und als Besalzungsmittel für elektrolytfreies Albumin feststellen konnten, daß sie die Eigenschaften eines guten Puffers besitzt. In der Tat ergab die elektrometrische Messung,

daß die Tanninlösungen in Normosal, selbst wenn sie noch konzentrierter waren, als wir sie für die *Wassermann*sche Reaktion verwendeten, ein p_H zwischen 7,0 und 7,6 aufwiesen. Trotzdem hatten auch diese Lösungen die Fähigkeit, ein negatives Serum positiv erscheinen zu lassen und *ohne jeden Serumzusatz* positive Reaktion zu ergeben (Protokoll, Tabelle X). Man darf aber diese Lösungen nur ganz frisch verwenden, da auch das Normosal nach etwa 24 Stunden das Tannin zersetzt hat. Jedenfalls können wir aber aus diesen Versuchen schließen, daß die Wirkung des Tannins bei der *Wassermann*schen Reaktion und der nach *Sachs-Georgi nicht* durch einfache Säurewirkung zu erklären ist.

Da auch die Tanninlösungen ohne Serum in stärkerer Konzentration bei der *Wassermann*schen Reaktion Eigenhemmungen zeigten, ist es dennoch wahrscheinlich, daß das Tannin auch eine direkte Wirkung auf das Komplement ausübt. Angesichts der Arbeiten von *Sachs* (31) und seinen Schülern über die „Hydrolabilität" des Komplements müssen wir bei unserer Vorstellung sogar eine solche Wirkung erwarten. Da aber nicht nur die *Wassermann*sche Reaktion, sondern auch die *Sachs-Georgi*sche Reaktion, die ja ohne Komplement angestellt wird, mit Tannin ebenso positiv ausfällt, wie mit luetischem Serum, so kann wohl als bewiesen gelten, daß das Tannin derartige Lipoidsole ebenso wie Farbstoffsole zu sensibilisieren vermag. *Es ist also durchaus denkbar, daß auch die Wirkung des luetischen Euglobulins im Gegensatz zu dem normalen auf einer Dehydratationsfähigkeit beruht, wie man sie beim Tannin als Erklärung für seine Fähigkeit zu sensibilisieren annimmt.* Natürlich ist dies nur eine *Vermutung*, die vorläufig noch nicht bewiesen werden konnte, aber es erscheint uns recht wichtig, darauf hinzuweisen, daß es noch Möglichkeiten gibt, das eigentümliche Reaktionsvermögen des luetischen Serums rein physikalisch-chemisch zu erklären, wenn auch die bisher darüber aufgestellten Theorien als widerlegt gelten müssen.

Wir sind uns klar darüber, daß die hier veröffentlichten Versuche mit Tannin[1]) lediglich einen Fingerzeig darstellen und auf breiterer Basis noch ausgebaut werden müssen. Immerhin erscheint uns die von uns entwickelte Theorie beachtenswert; denn auf ihr fußend, stellten wir Versuche mit Äthylurethan an, auf dessen hydrotrope Eigenschaft uns eine Arbeit von *C. Neuberg* (35) hinwies. Es ist ja

[1]) Daß auch Äther nach *Forssmanns* (30) Angabe bei der *Wassermann*schen Reaktion unter Umständen negative Sera in positive verwandeln kann, paßt angesichts der wasserentziehenden Wirkung des Äthers gut zu unseren Vorstellungen. Und analog zu unseren Versuchen berichtet auch *Forssmann*, daß diese Verwandlung bei *inaktiven* Seren nicht möglich ist, bzw. durch Inaktivieren rückgängig gemacht wird.

nicht unwahrscheinlich [vgl. *Freundlich* (36)], daß die hydrotropen Stoffe sich dadurch auszeichnen, daß sie sowohl eine hydrophile wie eine hydrophobe Gruppe haben; deshalb sind sie wohl imstande, einerseits eine Lösung ausgesprochen *hydrophober* Stoffe in Wasser zu begünstigen, andererseits *hydrophile* Micellen hydrophober zu machen, wenn sie sich mit ihrer hydrophilen Gruppe ihnen anlagern und ihre hydrophobe Gruppe nach außen kehren. Dieser letztere Fall liegt offenbar bei unseren Versuchsbedingungen vor. Und in der Tat konnten wir mit einer 10proz. Lösung von Äthylurethan denselben Effekt bei der *Wassermann*schen Reaktion erzielen wie mit Tannin. Wir fügen auch hierfür einige Protokolle (Tabellen XI bis XIII) im Anhange an. Diese Versuchsserie ist nicht so umfangreich wie die anderen, da wir mit ihr erst kurz vor Abschluß dieser Arbeit begonnen haben. Wir teilen aber den Befund hier schon mit, weil er besonders theoretisches Interesse beansprucht. Denn beim Äthylurethan kann noch viel sicherer als beim Tannin die Möglichkeit einer elektrischen Teilchenladung in wässeriger Lösung ausgeschlossen werden; ebenso hat es auch nicht im mindesten den Charakter einer Säure. Und dennoch ist es imstande, die als Antigen verwendeten Lipoidsole in ähnlicher Weise zu sensibilisieren wie das Tannin und wie das Euglobulin aus luetischen Seren.

Anhang.

Die hier aufgeführten Protokolle stellen natürlich nur typische Vertreter einer großen Zahl ihresgleichen dar. Des Raummangels wegen zeigen sie außerdem nur die Endresultate der ausführlichen Protokolle, die von jeder einzelnen Serumfraktion mit den üblichen Kontrollen von Extrakt und Serum allein angefertigt worden sind. Diese Originalprotokolle halten sich genau an das Schema, nach dem in der serodiagnostischen Abteilung der Breslauer Universitätsklinik auch sonst gearbeitet wird[1]). Wo in den folgenden Protokollen nicht ausdrücklich „Eigenhemmung" vermerkt ist, waren die Extrakt- und Serumkontrollen (bzw. die das Serum vertretenden Lösungen) einwandfrei gelöst. Bei der *Sachs-Georgi*schen Reaktion wenden wir die übliche Aufschreibungsart mit ein bis vier Kreuzen an, während wir bei der *Wassermann*schen Reaktion lediglich positiv, negativ, fraglich und Eigenhemmung angeben. Erwähnt sei noch, daß wir bei der *Wassermann*schen Reaktion meist alle Fraktionen in mehreren Verdünnungen untersuchten; dieselben werden hier in den Protokollen als Brüche angegeben.

---

[1]) Das Antigen — Menschenherzextrakte mit etwa 0,5proz. Cholesterinzusatz — wurde in der Verdünnung 1:5, das Komplement 1:10 verwendet. Nach einstündiger Bindung im Thermostaten wurden dem Versuch die mit der vierfach lösenden Ambozeptormenge sensibilisierten Hammelblutkörperchen hinzugefügt.

Protokolle.

Tabelle I.

Patient *L.* Pneumonie. Krankenhaus Westend. 8. Februar 1922.
Fraktionierung lediglich durch Elektrolyse.

	W. R.
Ursprüngliches Serum	—
Euglobulin	—
Albumin (+ Pseudoglobulin)	—
Albumin (isoliert)	—
Pseudoglobulin (isoliert)	—

Tabelle II.

Patient *M. S.* Lues manifesta. Krankenhaus Kirchstraße. 16. Februar 1922.
Fraktionierung wie oben.

	W. R.	S. G.
Ursprüngliches Serum	+	+++
Euglobulin	+	+++
Albumin (+ Pseudoglobulin) .	—	—
Albumin (isoliert)	—	—
Pseudoglobulin (isoliert) . . .	—	—

Tabelle III.

Patient *L. W.* Gonorrhöe. Krankenhaus Kirchstraße. 30. Oktober 1922.
Fraktionierung durch CO_2-Einleiten und nachträgliche Elektrolyse.

	p_H	W. R.	S. G.
Ursprüngliches Serum	7,751	$^1/_5$? $^1/_{20}$ —	—
Labilglobulin	7,180	$^1/_{20}$ Eigenhemmung $^1/_{640}$ —	?
CO_2-Restflüssigkeit	7,157	$^1/_5$ — $^1/_{20}$ —	—
Euglobulin	6,663	—	—
Albumin (+ Pseudoglobulin) .	6,086	—	—

Tabelle IV.

Patient *B. E.* Lues manifesta. Krankenhaus Kirchstraße. 30. Oktober 1922.
Parallelversuch zu Tabelle III.

	p_H	W. R.	S. G.
Ursprüngliches Serum	—	+	++++
Labilglobulin	7,180	+	+
CO_2-Restflüssigkeit	7,135	+	+±
Euglobulin	6,977	+	++±
Albumin (+ Pseudoglobulin) .	6,670	—	—

Tabelle V.

Patient *S. V.* Lues manifesta. Krankenhaus Kirchstraße. 13. Nov. 1922.
Fraktionierung wie Tabelle III.

	p_H	W.R.	S.G.
Ursprüngliches Serum	—	$^1/_5$ + $^1/_{20}$ +	++++
Labilglobulin	7,400	$^1/_{20}$ Eigenhemmung $^1/_{1600}$ " $^1/_{3200}$ —	+++
CO_2-Restflüssigkeit	6,739	$^1/_5$ + $^1/_{20}$ +	++
Euglobulin	6,739	$^1/_5$ + $^1/_{20}$ +	+++
Albumin (+ Pseudoglobulin) .	7,409	$^1/_5$ —	—

Tabelle VI.

Patient *G. W.* Lues manifesta. Krankenhaus Kirchstraße. 30. Nov. 1922.
Fraktionierung wie bei Tabelle III.

	p_H	W. R. aktiv	W.R. inaktiv	S. G.
Ursprüngliches Serum .	—	$^1/_5$ + $^1/_{15}$ +	$^1/_5$ + $^1/_{15}$ +	++++
Labilglobulin	7,511	$^1/_5$ Eigenhemmung $^1/_{15}$ " $^1/_{150}$ "	$^1/_5$ + $^1/_{15}$ +	+++
CO_2-Restflüssigkeit . .	6,0811	$^1/_5$ + $^1/_{15}$ +	$^1/_5$ + $^1/_{15}$ +	+
Euglobulin	6,767	$^1/_5$ + $^1/_{15}$ +	$^1/_5$ + $^1/_{15}$ +	++++
Albumin (+ Pseudogl.)	6,705	$^1/_5$ — $^1/_{15}$ —	$^1/_5$ —	—

Tabelle VII.

Patient *B. F.* Gonorrhöe. Krankenhaus Kirchstraße. 9. November 1922. Je 1 ccm dieses Serums wurde versetzt mit steigenden Mengen einer Lösung von 0,1 g reinstem Tannin (*E. Merck*) in 100 ccm physiologischer Kochsalzlösung. Die Serumkonzentration war in allen Versuchen konstant, da alle Röhrchen mit physiologischer Kochsalzlösung auf 5 ccm aufgefüllt wurden.

	W.R.	S. G. R.
Serum ohne Tannin	$^1/_5$ — $^1/_{10}$ —	—
1 ccm Serum + 0,1 ccm Tanninlösung	$^1/_5$ fast + $^1/_{10}$ fast +	1. Extrakt — 2. " +
1 ccm Serum + 0,25 ccm Tanninlösung	$^1/_5$ fast + $^1/_{10}$?	1. " + 2. " ++
1 ccm Serum + 0,5 ccm Tanninlösung	$^1/_5$ fast + $^1/_{10}$ fast +	—
1 ccm Serum + 1,0 ccm Tanninlösung	$^1/_5$ + $^1/_{10}$ +	— ?
1 ccm Serum + 2,0 ccm Tanninlösung	$^1/_5$ + $^1/_{10}$ +	+ ++
1 ccm Serum + 4,0 ccm Tanninlösung	$^1/_5$ Eigenhemmung $^1/_{10}$ fast +	— ?

Tabelle VIII.

Patient *Sch.* Gonorrhöe. Universitätsklinik Breslau. 28. Dezember 1922. Verfahren wie bei Tabelle VII.

	W. R. aktiv	W. R. inaktiv
Serum ohne Tannin	—	—
0,5 ccm Serum + 0,5 ccm Tanninlösung	+	—
0,5 ccm Serum + 1,0 ccm Tanninlösung	+	fast —
0,5 ccm Serum + 1,5 ccm Tanninlösung	Eigenhemmung	fast —
0,5 ccm Serum + 2,0 ccm Tanninlösung	„	fast +

Tabelle IX.

Steigende Mengen einer wie oben bereiteten Tanninlösung wurden mit physiologischer Kochsalzlösung sämtlich auf 2,5 ccm gebracht und ohne jeden Zusatz (wie Patientensera) der *Wassermann*schen Reaktion und *Sachs-Georgi*-Reaktion unterworfen. 29. Dezember 1922.

	W. R.	S. G.
0,25 ccm Tanninlösung	—	—
0,5 „ „	—	+
1,0 „ „	+	++++
1,5 „ „	Eigenhemmung	++++

Tabelle X.

Der gleiche Versuch wie Tabelle IX. Jedoch wird überall statt physiologischer Kochsalzlösung Normosallösung verwendet. Auch das Tannin war in Normosal aufgelöst; Konzentration wie Tabellen VII bis IX. 3. Januar 1923.

	W. R.	S. G.
0,25 ccm Tanninlösung	—	—
0,5 „ „	fast —	+
1,0 „ „	+	++++
1,5 „ „	Eigenhemmung	++++

Tabelle XI.

Patient *G.* Scabies. Krankenhaus Kirchstraße. 31. Januar 1923. Inaktiviert. Je 1 ccm dieses Serums wurde versetzt mit steigenden Mengen einer Lösung von 10,0 g reinstem Äthylurethan in 100 ccm physiologischer Kochsalzlösung. Die Serumkonzentration war in allen Versuchen konstant, da alle Röhrchen mit physiologischer Kochsalzlösung auf 5 ccm aufgefüllt wurden.

	W. R.
Serumkontrolle ohne Zusatz	—
1 ccm Serum + 1 ccm Äthylurethan	—
1 „ „ + 2 „ „	—
1 „ „ + 3 „ „	fast —
1 „ „ + 4 „ „	+
Äthylurethanlösung ohne Serum, unverdünnt	+

Tabelle XII.

R. B. Gesunder Kollege. 7. Februar 1923. Serum inaktiviert. Versuchsanordnung wie bei Tabelle XI.

	W. R.	S. G.
Serumkontrolle ohne Zusatz	—	—
0,5 ccm Serum + 1,8 Äthylurethan . . .	+	+
0,5 „ „ + 2,0 „ . . .	+	+
Äthylurethanlösung ohne Serum	+	—

Tabelle XIII.

Patient *M.* Eczema mammä. Krankenhaus Kirchstraße. 8. Februar 1923. Inaktiviert. Versuchsanordnung wie Tabellen XI und XII, jedoch wurde überall statt physiologischer Kochsalzlösung Normosallösung verwendet.

	W. R.	S. G.
Serumkontrolle ohne Zusatz	—	—
1 ccm Serum + 3,5 ccm Äthylurethan .	fraglich	—
1 „ „ + 4,0 „ „ .	+	+
10 proz. Äthylurethanlösung in Normosal, unverdünnt, ohne Serum	+	—

Zusammenfassung.

1. Die Nachprüfung der verschiedenen Theorien über physikalisch-chemische Unterschiede zwischen luetischen und nicht luetischen Seren sowie die eigenen neuen Versuche ergaben, daß ein solcher Unterschied *nicht* nachweisbar ist. Als Grund wird das zahlenmäßige Überwiegen der unspezifischen Albumine anzunehmen sein.

2. Es wurden luetische und nicht luetische Seren in ihre Eiweißfraktionen zerlegt. Es wurde dabei festgestellt, daß in der Literatur im allgemeinen als Euglobuline eine Fraktion bezeichnet wird, die nur einen kleinen Bruchteil der im Wasser unlöslichen Globuline darstellt. Dieser Bruchteil, für den der Name „Labilglobuline" vorgeschlagen wird, spielt bei den Luesreaktionen keine ausschlaggebende Rolle.

3. Es gelang, durch ein ausführlich beschriebenes Verfahren auch die *eigentlichen* Euglobuline auszufällen und durch Normosallösungen so zu peptisieren, daß sie anscheinend ihren natürlichen Dispersitätsgrad wieder erreichen, was bei dem bisher üblichen Peptisieren mit Kochsalzlösungen sicherlich nicht der Fall ist. Diese Euglobuline geben nach *Wassermann* wie nach *Sachs-Georgi immer* eine positive Reaktion, wenn das ursprüngliche Serum positiv reagierte. Euglobuline aus negativen Seren geben, wenn sie mit Normosal peptisiert werden, eine einwandfrei negative Reaktion. Das Restserum gibt immer (aus luetischen sowie aus nicht luetischen Seren) eine einwandfrei negative

Reaktion, gleichgültig, ob man in ihm noch die Albumine von den Pseudoglobulinen trennt oder beide zusammen untersucht. Es ist also hier zum erstenmal völlig einwandfrei nachgewiesen, in welcher Eiweißfraktion des Serums der Reaktionskörper zu suchen ist.

4. Auch die auf diese Weise isolierte und als Träger der *Wassermann*schen Reaktion erwiesene Euglobulinfraktion zeigt hinsichtlich ihrer elektrischen Ladung keinerlei Unterschiede entsprechend ihrem serologischen Verhalten. Die serologischen Luesreaktionen beruhen also *nicht* auf dem Ladungsausgleich entgegengesetzt geladener Teilchen.

5. Da Tannin (ebenso wie Globulin) imstande ist, Farbstoffsole zu sensibilisieren, *ohne* daß ein elektrischer Ladungsausgleich als Ursache in Frage kommt, schien ein anderer Weg gegeben, um eine rein kolloidchemische Theorie der *Wassermann*schen Reaktion zu ermöglichen. Es konnte gezeigt werden, daß Tanninlösungen geeigneter Konzentration nicht nur negative Seren in positive verwandeln, sondern auch ohne jeden Serumzusatz die Rolle des positiven Serums sowohl bei der Reaktion nach *Wassermann* wie bei der nach *Sachs-Georgi* zu spielen imstande sind. Es ist daher durchaus möglich, die spezifische Wirkung des luetischen Euglobulins ebenso als eine Dehydrationswirkung zu erklären wie die sensibilisierende Wirkung des Tannins.

Literatur.

Bezüglich der älteren Literatur kann nur auf die Verzeichnisse im Handbuch von *Kolle-Wassermann*, sowie in dem von *Krauss* und *Levaditi* verwiesen werden. Über die neuere Literatur findet man recht ausführliche Angaben in den unten zitierten Zusammenfassungen von *Weisbach* (15) und *Baumgaertel* (4).

1) *Landsteiner, Müller* und *Poetzl*, Wien. klin. Wochenschr. 1907, Nr. 50. — 2) *Meier* und *Porges*, Berlin. klin. Wochenschr. 1908, Nr. 15. — 3) *Epstein* und *Paul*, Arch. f. Hyg. **90**, Heft 3. — 4) *Baumgaertel*, Ergebn. d. Hyg., Bakteriol., Immunitätsforsch. u. exper. Therap. **5**. Daselbst Verzeichnis der älteren Arbeiten desselben Autors. — 5) *Kopaczewski*, C. r. **171**, Heft 23, 1920. — 6) *Epstein, Paul* und *Lorenz*, Kolloid-Zeitschr. **31**, Heft 4. — 7) *Paul Schmidt*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **69**; Kolloid-Zeitschr. **10**, Nr. 1. — 8) *Rondoni*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. (Orig.) **34**, Heft 5. — 9) *Paul Hirsch* und *Max Liebers*, Fermentforsch., 6. Jahrg., Nr. 2. — 10) *v. Wassermann*, Klin. Wochenschr., 1. Jahrg., Nr. 22. — 11) *R. Otto* und *W. F. Winkler*, Med. Klinik 1922, Nr. 25. — 12) *J. Reitstoetter*, Österr. Chemiker-Zeitung 1922; daselbst Verzeichnis der älteren Arbeiten desselben Autors. — 13) *Bethe* und *Toropoff*, Zeitschr. f. physik. Chem. 88/89. — 14) *Wo. Pauli*, Kolloid-Zeitschr. **31**, Heft 5. — 15) *W. Weisbach*, *Wassermann*sche Reaktion und Ausflockungsreaktionen. Jena, Gustav Fischer, 1921. — 16) *G. Kapsenberg*, Zeitschr. f. Immunitätsforschung, Orig.-Bd. **31**, Heft 2. — 17) *Hans Sahlmann*, ebendaselbst. Orig.-Bd. **33**, Heft 2. — 18) *Gloor* und *Klinger*, ebendaselbst **29**, Heft 5. — 19) *Mandelbaum*, Münch. med. Wochenschr. 1920, S. 962. — 20) *Hans Sachs*, Berlin. klin. Wochenschr. 58, Nr. 36. Daselbst Verzeichnis der älteren

Arbeiten desselben Autors. — 21) *Zsigmondy*, Kolloidchemie. Leipzig, Verlag Otto Spamer, 1922. — 22) *Freundlich* und *Brossa*, Zeitschr. f. physik. Chem. **89**, Heft 3. — 23) *Windisch* und *Bermann*, s. *Freundlich*, Kapillarchemie, S. 805. Akademische Verlagsanstalt, 1922. — 24) *H. R. Kruyt*, Kolloid-Zeitschr. **31**, Heft 6. — 25) *Freundlich* und *Brossa*, erscheint demnächst in der Kolloid-Zeitschr. — 26) *W. Bachmann*, Zeitschr. f. Immunitätsforschung, Orig.-Bd. **33**, Heft 3; **34**, Heft 4. — 27) *H. Sachs* und *K. Altmann*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exper. Therap. **26**, Heft 5. Daselbst Verzeichnis früherer Arbeiten. — 28) *L. Michaelis* und *P. Skwirsky*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch., Orig.-Bd. **4**, 357; sowie *L. Michaelis*, Die Wasserstoffionenkonzentration. Julius Springer, 1914. — 29) *Ruppel*, Ber. d. pharm. Gesellsch., 30. Jahrg., Heft 5. — 30) *Forssmann*, diese Zeitschr. **121**, Heft 1/4; **124**, Heft 1/6. — 31) *Sachs* und *Altmann*, ebendaselbst **78**, Heft 1/2. — 32) *Guggenheimer*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **11**, Heft 3. — 33) *Neukirch*, Arbeiten aus dem Institut für experimentelle Therapie zu Frankfurt a. M. 1920, Heft 10. — 34) *H. Sachs*, Kolloid-Zeitschr. **24**; Arch. f. Dermatologie u. Syphilis **132**, 17. — 35) *C. Neuberg*, diese Zeitschr. **76**. — 36) *H. Freundlich* und *P. Scholz*, Kolloidchemische Beihefte **16**, 246. — 37) *Ruppel*, *Ornstein*, *Carl* und *Lasch*, Zeitschr. f. Hyg. **97**. — 38) *Oeller* und *Schierge*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **36**, 1922. — 39) *A. Riekmann*, D. R.-P. Nr. 71378, Kl. 75. — 40) *Harold*, Journ. of the roy. army med. corps **39**, 2. — 41) *Mc Donagh*, Brit. journ. of dermatol. **34**, 2. — 42) *Skrop*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. Orig. **35**, 5. — 43) *R. Stern*, erscheint demnächst ebendaselbst. — 44) *Mackie*, Journ. of pathol. **26**, 1. — 45) *Renaux*, C. r. **83**, 28. — 46) *Tannenberg*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. Orig. **32**, 5. — 47) *Sachs* und *Sahlmann*, Dtsch. Med. Wochenschr. **47**, 37. — 48) *Bauer* und *Nyiri*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. Orig. **36**, 1923. — 49) *Sachs* und *Georgi*, Klin. Wochenschr. 2. Jahrg., Nr. 19.

Bei der Abfassung dieser Arbeit standen mir Mittel zur Verfügung, die mir der Ausschuß zur Förderung des wissenschaftlich-medizinischen Nachwuchses (Hilfsausschuß der *Rockefeller*-Foundation) als Forschungsbeihilfe bewilligt hatte. Es ist mir ein Bedürfnis, auch an dieser Stelle meinem aufrichtigen Danke dafür Ausdruck zu geben.

Über Sulfatase.

IV. Mitteilung.

Über die enzymatische Spaltung der β-Naphthol-schwefelsäure.

Von

J. Noguchi.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für experimentelle Therapie und Biochemie in Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 5. November 1923.)

Die Wirksamkeit des Ätherschwefelsäuren spaltenden Fermentes, der *Sulfatase,* ist bisher von *C. Neuberg* und *K. Kurono*[1]) gegenüber der Phenol-äther-schwefelsäure, sowie von *C. Neuberg* und *K. Linhardt*[2]) in bezug auf die p-Kresol-schwefelsäure festgestellt worden. Sodann habe ich selbst[3]) im hiesigen Institute gezeigt, daß das Enzym seine Wirksamkeit auch in einem von der Natur gelieferten Medium, nämlich im Harn, entfaltet; dabei ergab sich, daß die Ätherschwefelsäureverbindungen, die sich im Urin des Pferdes, Hammels und Kaninchens vorfinden, durch die Sulfatase nahezu vollständig hydrolysiert werden können.

Die bisherigen Untersuchungen der Sulfatase erstreckten sich auf ihr Verhalten gegenüber solchen Äthersulfaten, die unter physiologischen Bedingungen auftreten. Die biochemische Paarung mit Schwefelsäure erfolgt nun keineswegs allein mit Phenolen, die der intermediäre Stoffwechsel liefert, sondern auch mit zahlreichen Substanzen, die dem Tierkörper einverleibt werden, sei es daß dieselben unmittelbar eine für die Kuppelung mit der Schwefelsäure notwendige Hydroxylgruppe enthalten, oder daß sie diese erst im Organismus durch eine Umformung erwerben.

Als Typus einer solchen „patho-chemischen" Verbindung wählte ich die *β-Naphthol-schwefelsäure*; gemäß vorliegenden Angaben ist sie nach Einreibung von β-Naphthol in die Haut sowie nach Verfütterung dieses Körpers (neben β-Naphthol-glucuronsäure) im Harn vorhanden[4]).

---

[1]) *C. Neuberg* und *K. Kurono,* diese Zeitschr. **140**, 295, 1923.

[2]) *C. Neuberg* und *K. Linhardt,* ebendaselbst **142**, 191, 1923.

[3]) *J. Noguchi,* ebendaselbst **143**, 186, 1923.

[4]) *J. Mauthner,* Wien. med. Jahrb. **1881**, 201; *M. Lesnik* und *M. Nencki,* Ber. **19**, 1535, 1886.

Die benutzte β-Naphthol-schwefelsäure habe ich durch Synthese gewonnen.

Die 1 proz. wässerige Lösung des reinen Kaliumsalzes wurde dem Einfluß des Fermentes ausgesetzt; dabei wurde das Substrat von der Sulfatase in typischer Weise zerlegt.

A. Darstellung der β-Naphthol-schwefelsäure.

Die Einzelheiten ergeben sich aus folgendem: Zur Lösung von 10 g β-Naphthol in 20 ccm Pyridin wurde unter Eiskühlung und ständigem Rühren eine Mischung von 8,4 ccm Chlorsulfonsäure mit 50 ccm Chloroform tropfenweise gegeben. Darauf wurden das Chloroform nebst überschüssigem Pyridin im Vakuum bei 40° abgedunstet und der Rückstand mit starker Kalilauge bis zur schwach alkalischen Reaktion auf Lackmus versetzt. Nachdem nun das in Freiheit gesetzte Pyridin ebenfalls in vacuo abdestilliert worden war, wurde der restierende Salzkuchen mit heißem Wasser aus dem Kolben herausgespült und durch mehrfaches Umkristallisieren aus kochendem Wasser von anorganischen Beimengungen befreit.

0,0726 g Substanz: 0,0632 g $BaSO_4$;
0,3371 g „ 0,1112 g K_2SO_4.

$C_{10}H_7 . O . SO_3K$: Ber. S = 12,21 Proz.; K = 14,88 Proz.;
gef. S = 11,95 „ ; K = 14,84 „ .

Eigenschaften des Kaliumsalzes: Das β-naphthol-schwefelsaure Kalium scheidet sich in feinen weißen Blättchen aus, die in kaltem Wasser schwer, in heißem Wasser ziemlich löslich sind. Ähnlich verhält es sich gegen Alkohol: in Äther ist es unlöslich. Salzsäure spaltet beim Erwärmen in die Komponenten. Die wässerige Lösung des Kaliumsalzes gibt mit Bariumchlorid, Bleiacetat und Kupfersulfat keine Niederschläge.

B. Einwirkung von Sulfatase auf β-naphthol-schwefelsaures Kalium.

Hinsichtlich der Ausführung der Fermentversuche schloß ich mich an die von *C. Neuberg* und *K. Linhardt* (l. c.) gewählte Versuchsanordnung an. Die sulfatische Hydrolyse wurde durch Ermittelung des ungespaltenen Teiles von β-Naphthol-schwefelsäure verfolgt; der Gang der Analyse ist einfacher für die Bestimmung der noch in organischer Bindung verbliebenen Schwefelsäure als für die Feststellung der in Freiheit gesetzten Menge von Sulfat-ionen.

Verwendet wurden:

I. Eine Lösung von 1,0 g β-naphthol-schwefelsaurem Kalium in 100 ccm Wasser + 1 ccm Toluol + 0,1 g Ferment.

II. Eine Lösung von 1,0 g β-naphthol-schwefelsaurem Kalium, 100 ccm Wasser, 1 ccm Toluol sowie 0,2 g Enzym.

III. Ein Gemisch der gleichen Bestandteile, aber mit verdoppelter Fermentmenge, d. h. mit 0,4 g Sulfatase.

Spaltung in Proz. nach Tagen bei 32°	I	II	III
	Fermentmenge		
	0,1 g	0,2 g	0,4 g
1	7,23	9,55	13,56
2	—	15,46	18,98
3	8,74	18,84	22,46
4	—	18,84	24,05
5	8,73	—	24,41
6	—	—	24,40

Die Tabelle lehrt, daß die Zerlegung mit Zeit und Enzymquantität zunimmt, doch wird verhältnismäßig schnell ein Endzustand erreicht. Im günstigsten Falle habe ich eine Hydrolyse im Umfange von einem Viertel des theoretisch möglichen Ausmaßes erzielt.

Es sei noch eine andere Versuchsreihe mit verdoppeltem Substratquantum angeführt, und zwar kamen:

IV. 2,0 g β-naphthol-schwefelsaures Kalium mit 100 ccm Wasser, 1 ccm Toluol und 0,1 g Ferment, sowie

V. 2,0 g β-naphthol-schwefelsaures Kalium + 1 ccm Toluol + 0,2 g Sulfatase in Berührung.

Folgendes war das Ergebnis:

Spaltung in Proz. nach Tagen bei 38°	IV	V
	Fermentmenge	
	0,1 g	0,2 g
1	9,69	11,52
3	9,74	11,75
5	—	11,77

Zusammenfassung.

1. Die Wirkung der Sulfatase erstreckt sich auch auf „abnorme“ Äther-schwefelsäuren, wie β-Naphthol-schwefelsäure.

2. Die β-Naphthol-schwefelsäure wurde unter den gewählten Versuchsbedingungen bis zu rund 25 Proz. zerlegt; es ist jedoch kaum zweifelhaft, daß die Hydrolyse mit größeren Fermentmengen oder frischerem Enzymmaterial weiter getrieben werden kann[1]).

3. Es werden die synthetische Darstellung von β-naphthol-schwefelsaurem Kalium sowie die Eigenschaften dieser Substanz beschrieben.

[1]) Über entsprechende Erfahrungen bei der fermentativen Spaltung des Indicans werden *Neuberg* und *Wagner* später berichten.

Die Wirkung der Collargolblockade der Leber auf den intermediären Stoffwechsel.

Von

Suganuma (Nagasaki).

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 8. November 1923.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

Durch eine Reihe experimenteller Arbeiten ist die Beziehung des Collargols zu den *Kupffer*schen Sternzellen der Leber nachgewiesen worden. Collargolinjektionen in die Blutbahn führen zu anatomisch nachweisbaren Silberniederschlägen in den *Kupffer*schen Zellen. [*Brötz* (2), Die *v. Kupffer*schen Sternzellen und ihr Verhalten gegenüber Kolloidmetallen, und *Petroff* (9), Untersuchungen über die Ablagerung kolloidaler Substanzen in der Leber.]

Die Collargolblockade der *Kupffer*schen Zellen kann ebensowohl die Gallenbereitung und damit die äußere Sekretion der Leber beeinflussen, wie auch den intermediären Stoffwechsel, soweit er durch die Leber beeinflußt wird. Denn die *Kupffer*schen Zellen sind ja in die Lymphräume eingesponnen, die zwischen der intralobulären Kapillare der Vena interlobularis der Pfortader und den Leberzellen liegen. Für alle Stoffe, die von der Pfortader zu den Leberzellen gelangen, können die *Kupffer*schen Zellen als Transportvermittler in Tätigkeit treten, wie sie auch an der Umformung dieser Stoffe beteiligt sein können, an einer Umformung, die also schon möglich ist, noch bevor die betreffenden Substanzen die Leberzellen erreicht haben. Auch der umgekehrte Fall ist zu berücksichtigen, daß nämlich Stoffe, die in den Leberzellen gebildet worden sind, durch Vermittlung der *Kupffer*schen Zellen retrograd an die Pfortader abgegeben werden.

Einschränkend ist zu allen Versuchen, die sich mit dem intermediären Stoffwechsel nach Collargolinjektionen beschäftigen, zu sagen, daß eine allgemeine toxische Wirkung des Collargols niemals ganz ausgeschlossen werden kann, und daß dadurch Phänomene aufzutreten vermögen, die nicht unmittelbar mit der Blockade der Kupfferzellen

etwas zu tun haben. Man muß sich jedoch immer daran erinnern, daß das Collargol ein recht differentes Mittel ist, das man dem Körper bei diesen Versuchen einverleibt. Jedenfalls aber lohnt es sich einmal, Befunde zu sammeln, wie intermediäre Stoffwechselstörungen, und ob sie überhaupt durch Collargolinjektionen entstehen. Ob für die eventuell auftretenden Veränderungen dann die Blockade der Kupfferzellen oder andere toxische Wirkungen verantwortlich gemacht werden müssen, muß sich aus einer kritischen Besprechung der Versuchsresultate ergeben.

Zunächst möchte ich den Einfluß der Collargolinjektionen auf die Gallenabsonderung besprechen.

Meine Beobachtungen habe ich an Hunden gemacht, denen nach der Unterbindung und Durchschneidung des Ductus choledochus eine permanente Gallenblasenfistel mit Hilfe einer Metallkanüle angelegt worden war. Alle Versuche wurden am nüchternen Tiere gemacht, das während der ganzen Versuchszeit immer die gleiche Nahrung bekam und 12 Stunden vor der jeweiligen Collargolinjektion die letzte Nahrung erhalten hatte. Ich beobachtete zunächst 2 Stunden lang die spontane Gallensekretion des nüchternen Tieres, indem ich die aus der Fistel abfließenden Gallenmengen halbstündlich sammelte und maß. Nunmehr wurde die Collargolinjektion gemacht, und zwar in die Ohrvene. Auf 8 kg Körpergewicht kamen 1,5 ccm der 5proz. Collargollösung. Jetzt wurde wieder in der soeben beschriebenen Weise die Gallensekretion beobachtet.

Ich nehme das allgemeine Resultat meiner Beobachtungen hier zunächst vorweg. Vor der Collargolinjektion zeigen die Nüchternwerte der Gallensekretion sehr kleine Schwankungen. Zwischen der dritten und fünften halben Stunde tritt eine deutliche Veränderung in der Gallenabsonderung nach der Collargolinjektion auf. Diese Veränderung gipfelt darin, daß die zur Abscheidung kommenden halbstündlichen Gallenmengen allmählich geringer werden und erst in der sechsten halben Stunde wieder ansteigen, und zwar übernormale Werte erreichen. In der Abb. 1 teile ich drei Versuche mit, die das eben Gesagte illustrieren.

Bei der Beurteilung dieser Versuchsergebnisse muß man sich die Frage vorlegen, ob wir es bei den Veränderungen in der Gallenabsonderung durch die Kanüle mit einer Sekretionsstörung der Leberzellen oder mit einem motorischen Effekt auf die Gallenwege zu tun haben. Liegt eine Sekretionsstörung vor, dann müßte man die Vermehrung der Gallenmenge mit dem Nachlassen der Collargolwirkungen als Ausdruck des Zustandes einer gesteigerten Reizbarkeit der *Kupffer*schen Zellen mit dem Abklingen der Lähmung ansehen. Läge eine Motilitätsstörung vor, dann hätten wir in der übernormalen Gallenabscheidung

durch die Kanüle den Ausdruck einer voraufgegangenen Retention, und es müßte das Collargol einen Spasmus der Gallenwege verursachen. Anhaltspunkte für diese Auffassung liegen nicht vor. So werden wir das ganze Phänomen als Sekretionsstörung auffassen dürfen, und zwar um so mehr, als meine Beobachtungen über den intermediären Stoffwechsel nach der Collargolinjektion auch hier ganz ähnliche Erscheinungen erkennen ließen.

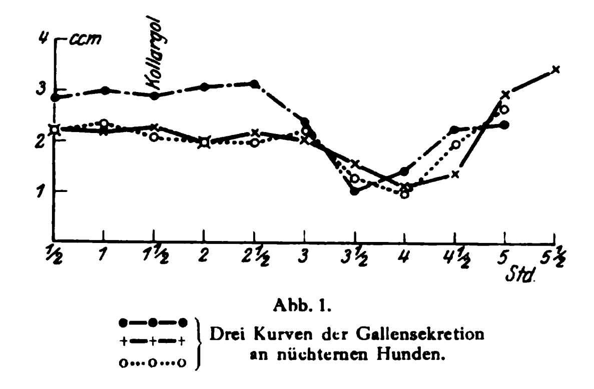


Abb. 1.

●—●—● +—+—+ o···o···o } Drei Kurven der Gallensekretion an nüchternen Hunden.

Ich wende mich nunmehr meinen Beobachtungen über den Einfluß der Collargolinjektionen auf den intermediären Stoffwechsel zu. Den intermediären Stoffwechsel in der Leber definiert *F. Laqueur* in seinem Referate „Die Stellung der Leber im intermediären Stoffwechsel" treffend in folgender Weise: Die durch Oxydation sowie andere ohne Sauerstoffaufnahme verlaufende exotherme Spaltungsvorgänge freiwerdende Energie dient der Leber zum Teil zum endothermen Um- und Aufbau der verschiedenen, ihr mit der Vena portae zuströmenden Nahrungsstoffe. Alle diese Umsetzungen können als intermediärer Stoffwechsel in der Leber zusammengefaßt werden, wobei von manchen diesen Reaktionen nicht unbedingt sicher ist, ob sie ausschließlich in der Leber oder auch in anderen Körperorganen stattfinden. Meine Beobachtungen erstrecken sich ausschließlich auf den Kohlehydrat- und Eiweißstoffwechsel.

Obwohl die Leber fortwährend, besonders natürlich während der Verdauung, Zucker aus dem Blute zur Glykogenbildung aufnimmt, führt eine Ausschaltung der Leber doch zu einer Hypoglykämie. Ich beziehe mich dabei auf die Versuche der Leberexstirpation am Hunde (vgl. *A. Bickel*, Deutsch. med. Wochenschr. 1923, Nr. 5). Wenn eine Blockierung der Leber das gleiche Phänomen zur Folge haben müßte, dann wäre, wenn die *Kupffer*schen Sternzellen etwas mit dem Zuckertransport von der Pfortader in die Leber zu tun haben, eine Hypoglykämie nach der Collargolinjektion zu erwarten. Dagegen spricht

bei meinen Versuchen, bei denen ich in der Tat eine starke Hyperglykämie nach der Collargolinjektion feststellte, daß diese Hyperglykämie im nüchternen Zustande der Tiere auftrat, also zu einer Zeit, in der gewiß nicht viel Zucker in die Leber eintritt, sondern eher mehr Zucker die Leber durch die Glykogenrückbildung in Zucker verläßt.

Wenn also so durch die Collargolinjektion ein verstärkter Rückfluß von Zucker aus der Leber in das Blut Platz greift, und wenn das Collargol auf die Sternzellen lähmend wirkt, dann kann unmöglich eine Tätigkeit dieser Zellen beim Transport des Zuckers aus der Leber in das Blut in Frage kommen. Wir müssen also annehmen, daß das Collargol mit großer Wahrscheinlichkeit auch auf die Leberzellen selbst wirkt, in ihnen eine Mobilisation des Glykogens durch Reizung bewirkt, und daß der aus dem Glykogen gebildete Zucker die Leber auf dem Wege der Vena centralis verläßt.

In der Abb. 2 teile ich vier Versuche mit, aus denen hervorgeht, wie etwa 1 Stunde nach der Collargolinjektion der Blutzuckerspiegel ansteigt, die Steigerung hält 2 bis 3 Stunden an, dann sinkt der Blutzuckerspiegel, erreicht vorübergehend subnormale Werte und kehrt dann langsam auf die Höhe zurück, die er vor der Collargolinjektion gehabt hatte. Das hypoglykämische Stadium kann vielleicht als Erschlaffung der Leberzellen nach der voraufgehenden starken Reizung gedeutet werden.

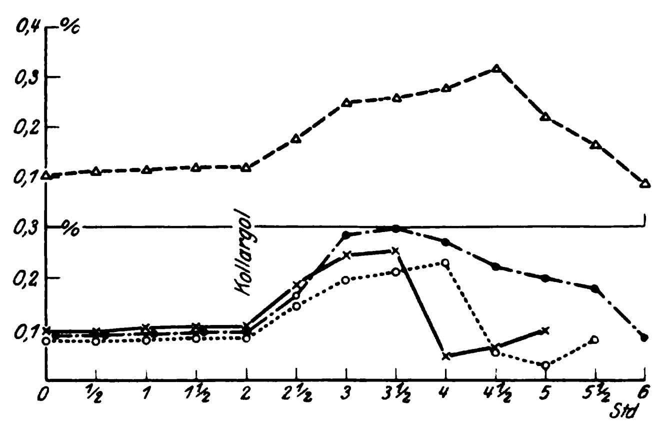


Abb. 2. Blutzuckerkurven. Die oberste Kurve wurde an einem nüchternen Hunde gewonnen, der seit 10 Tagen nur mit Salz und Wasser gefüttert worden war. (*Osborns* Salzgemisch.) Die drei unteren Kurven wurden an einfach nüchternen Tieren gewonnen.

Ich wende mich nunmehr zu meinen Beobachtungen über den Einfluß der Collargolinjektion auf den Aminosäuregehalt des Blutes zu. Aminosäuren können einmal in der Leber selbst entstehen durch Abbau des in der Leber vorhandenen Eiweißes, zweitens kann der

Leber durch das Pfortaderblut Aminosäure zugeführt werden, die anderer Provenienz sind. Es steht jedenfalls so viel fest, daß die Leber die Fähigkeit hat, Aminosäuren weiter abzubauen bzw. umzubauen. Bei meinen Versuchen habe ich nun in zwei Fällen gefunden, daß als Folge der Collargolinjektion eine starke Erhöhung im Aminosäuregehalt des Blutes auftritt, die nach einiger Zeit sich wieder ausgleicht. Eine theoretische Erklärung läßt sich für dieses Phänomen heute kaum geben, da wir zu wenig über die Rolle der Leber beim Aminosäureumsatz unterrichtet sind, und da nicht einmal feststeht, ob wir es bei meinen Versuchen als Ursache der Erscheinung lediglich mit einer Leberfunktionsstörung oder mit einer allgemeinen toxischen Wirkung des Collargols zu tun haben. Ich will nicht unerwähnt lassen, daß ein dritter Versuch mit diesem Resultat nicht übereinstimmte.

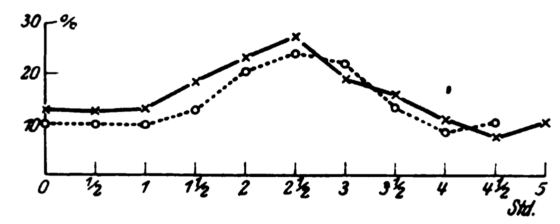


Abb. 3. Kurven über den Aminosäuregehalt des Blutes. Collargolinjektion erfolgt am Ende der ersten Stunde.

Durchsichtiger sind die Versuche über die Beeinflussung des Harnstoffgehaltes des Blutes durch Collargolinjektionen. Der Harnstoff wird vornehmlich in der Leber synthetisch gebildet. Da in meinen Versuchen der Harnstoffgehalt des Blutes nach der Collargolinjektion beträchtlich sank, können wir annehmen, daß entweder die harnstoffbildende Funktion der Leberzelle Not gelitten hat oder, daß die Harnstoffabgabe bei normaler oder verminderter Bildung durch die Blockade der Kupfferzellen an das Blut unmöglich geworden ist. Da wir bei den Zuckerversuchen als wahrscheinlich annehmen mußten, daß das Collargol keine Lähmung, sondern eine Reizung der Leberzellen hervorruft, so ist es wahrscheinlich, daß Gleiches auch für die harnstoffbildende Funktion gilt, oder daß wenigstens doch keine Lähmung dieser Funktion eingetreten ist. Daraus würde folgen, daß wir es bei der Harnstoffabnahme des Blutes mit einer Ausscheidungsstörung zu tun haben, in dem durch die Blockade der Kupfferzellen der gebildete Harnstoff aus der Leberzelle nicht mehr ins Blut gelangen kann.

Nun hat *Leschke* mittels der histochemischen Methode gefunden, daß die Ausscheidung des Harnstoffs aus der Leberzelle in Lymphe und Blut nicht nur direkt von den Leberzellen aus erfolgt, sondern auch durch die *Kupffer*schen Sternzellen reguliert wird. Dabei füllen sich diese mit Harnstoff an und geben ihn allmählich an die Lymphe

ab. Mit diesen Beobachtungen *Leschkes* stimmen meine Befunde in ausgezeichneter Weise überein. In der Abb. 4 teile ich meine Versuche über den Einfluß der Collargolinjektion auf den Harnstoffgehalt des Blutes mit.

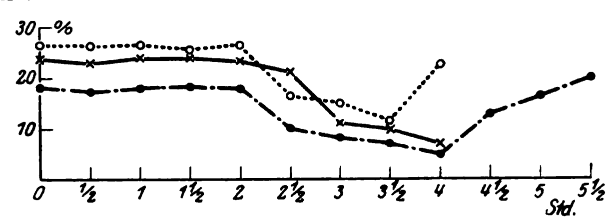


Abb. 4. Kurven über den Harnstoffgehalt des Blutes. Collargolinjektion erfolgte am Ende der zweiten Stunde.

Wenn wir nun die Kurven über den Blutzuckergehalt und den Harnstoffgehalt des Blutes nach der Collargolinjektion untereinander vergleichen, dann erkennen wir den konträren Verlauf der beiden Kurven: Der Blutzucker steigt an und der Harnstoff nimmt ab. Da es sich nach den Versuchen *Leschkes* bei dem Harnstoff zweifellos um eine Ausscheidungsinsuffizienz handelt durch Lähmung der Sternzellen, kann es sich bei dem Blutzuckerphänomen wohl nur um eine Reizung der Leberzellen handeln. Zugleich wird daraus ersichtlich die Verschiedenheit der Abflußwege: der Zucker verläßt die Leber vornehmlich auf dem Wege der Vena centralis, der Harnstoff aber verläßt sie vornehmlich auf dem Wege der Vena porta durch Vermittlung der *Kupffer*schen Sternzellen. Das ist das *wesentliche Ergebnis* meiner Versuche.

Literatur.

1) *Bickel*, Deutsch. med. Wochenschr. **5**, 1923. — 2) *Brötz*, Frankf. Zeitschr. f. Path. **3**, 1909. — 3) *Fischler*, Physiologie und Pathologie der Leber. Berlin 1916. — 4) *Géza Heteny*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. 1922, Heft 5/6. — 5) *F. Laqueur*, Klin. Wochenschr. **17**, 1922. — 6) *Leschke*, Zeitschr. f. exper. Path. u. Therap. **156**. — 7) *Lichtwitz*, Klinische Chemie. Berlin 1918. — 8) *Magnus-Alsleben*, Über die Bedeutung der *Eck*schen Fistel für die normale und pathologische Physiologie der Leber. Ergebn. d. Physiol. 1920, S. 1851. — 9) *Petroff*, Untersuchungen über die Ablagerung kolloidaler Substanzen in der Leber. Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **35**, Heft 4/6. — 10) *Schmitz*, Kurzes Lehrbuch der chemischen Physiologie. Berlin 1921.

Bemerkungen über die Nephelometrie von Eiweißlösungen.

Von

Stefan Rusznyák.

(Aus der III. medizinischen Klinik dei Universität in Budapest.)

(Eingegangen am 9. November 1923.)

An meiner Methode der nephelometrischen Bestimmung des Albumin-Globulinquotienten (1), welche seither auch auf sämtliche Eiweißfraktionen ausgearbeitet wurde (2), ist in der letzten Zeit durch *P. Rona* und *H. Kleinmann* eine scharfe Kritik geübt worden (3). Dieser Kritik gegenüber, welche nicht auf experimentelle Nachprüfung, sondern nur auf theoretische Erwägungen gestützt ist, möchte ich mir einige Bemerkungen erlauben.

Aus den Zeilen 13 und 22 S. 462 der erwähnten Arbeit geht hervor, daß die Autoren meine Methode nicht nur nicht nachgeprüft, sondern auch mißverstanden haben, da sie von einer Abfiltration der Globuline sprechen. In meiner Arbeit ist von dergleichen nicht die Rede.

Weiter wird behauptet, daß die Methode im Prinzip falsch sei, da sie zwei Trübungen vergleicht, „deren kolloidaler Zustand (Dispersität usw.) völlig verschieden ist". Hierzu ist zu bemerken, daß wir über die Dispersität von Albumin- und Globulinlösungen nichts Bestimmtes wissen, da diese — im Gegensatz zu Suspensionskolloiden — bei Eiweißlösungen nicht bestimmt werden kann. Dabei handelt es sich bei der Nephelometrie gar nicht um Eiweißlösungen, sondern um Eiweißniederschläge, über deren Teilchengröße wir, wenn möglich, noch weniger etwas aussagen können. Zieht man nun in Betracht, daß die Ergebnisse meiner Methode gut mit der gravimetrischen übereinstimmen, so folgt daraus, *daß nicht meine Methode, sondern die dagegen erhobenen theoretischen Einwendungen im Prinzip falsch sind.*

Der Einwand endlich, daß die nach meiner Methode hergestellten Trübungen eine starke Tendenz zu Flocken zeigen und dadurch „die Messung völlig ungenau gestalten", wird einerseits ebenfalls durch die gravimetrische Kontrolle widerlegt, andererseits auch durch die Tatsache, daß das Serum einer Person an verschiedenen Tagen unter

denselben Bedingungen untersucht, fast genau dieselben Resultate ergibt. Ich habe außerdem noch Versuche angestellt und nach dem Vorgehen von *Rona* und *Kleinmann* die eventuelle Änderung der Trübung mit dem Nephelometer untersucht. Die Eiweißtrübungen wurden mit einer Stärkelösung verglichen, wobei die Fenstergröße der Eiweißlösung konstant gehalten und jene der Stärkelösung verändert wurde. Es seien hier zwei solche Versuche mitgeteilt, und zwar eine Gesamteiweiß- (I.) und eine Globulinfällung (II.). Die Zahlen bedeuten die Fenstergrößen in Millimetern.

I.

Zeit	Eiweißlösung	Stärkelösung
5′	20	15,1
10	20	15,0
20	20	15,4
30	20	15,3
60	20	15,4

II.

Zeit	Eiweißlösung	Stärkelösung
5′	30	14,5
10	30	14,6
20	30	14,5
30	30	14,7
60	30	14,6

Aus den beiden Tabellen ist ersichtlich, daß der Trübungsgrad der Eiweißfällungen selbst nach einer Stunde keine meßbare Veränderung aufweist, um so weniger also während der paar Minuten, die zur Ausführung der Ablesungen nötig sind.

Auf Grund der Tatsachen, daß meine nephelometrische Methode der Bestimmung des Albumin-Globulinquotienten (wie auch der übrigen Eiweißfraktionen) 1. mit der gravimetrischen Methode gut übereinstimmt, 2. daß bei den angewendeten Konzentrationen, bei der Verwendung von Menschenplasma, durch Flockung der Trübungsgrad nicht merklich verändert wird, 3. daß die Methode bei derselben Person bei wiederholten Untersuchungen dieselben Resultate ergibt, und 4. daß die Ergebnisse, welche nunmehr bei über 300 Kranken gewonnen wurden, mit denen anderer Untersucher übereinstimmen, glaube ich behaupten zu können, *daß die Methode brauchbar ist und die dagegen von Rona und Kleinmann erhobenen Einwände unbegründet sind.*

Literatur.

1) Diese Zeitschr. **138**, Heft 4/6, S. 370. — 2) Ebendaselbst **141**, Heft 4/6, S. 479. — 3) Ebendaselbst **140**, Heft 4/6, S. 461.

Saccharophosphatase in menschlichen Organen.

Von

Elemér Forrai.

(Aus dem k. ungarischen pflanzenbiochemischen Institut in Budapest und aus dem chemischen Institut der Universität Szeged.)

(Eingegangen am 10. November 1923.)

Von *Neuberg* wurde die Frage aufgeworfen, ob die in den Organismen nicht nachweisbaren, künstlich dargestellten Phosphorsäureester der biologischen Zerlegung fähig sind. Nach *Neuberg* offenbart sich eine starke Neigung der Lebewesen, den organisch gebundenen Phosphor in ihren Stoffwechsel aus synthetisch dargestellten Phosphorsäureestern einzubeziehen. So zeigten *C. Neuberg* und *W. Örtel*[1]), daß von auf chemischem Wege phosphorylierten Eiweißkörpern (Albumosen und Peptonen) unter dem Einfluß von Verdauungsfermenten Phosphorsäure abgespalten wurde. Ferner konnte auch von *C. Neuberg* und *L. Karczag*[2]) gezeigt werden, daß synthetisches, glycerinphosphorsaures Natrium durch Hefen zerlegt wird; dasselbe wurde von *Grosser* und *Hussler*[3]) und *Forrai*[4]) für tierische und auch menschliche Organe bestätigt. Der von *Neuberg* und *Pollak*[5]) dargestellte Phosphorsäureester des Rohrzuckers — die Saccharosemonophosphorsäure — kann als körperfremde Substanz betrachtet werden, da eine Phosphorsäureverbindung der Disaccharide bisher als Naturprodukt nicht beobachtet wurde.

Die Saccharosephosphorsäure wird — wie *C. Neuberg* und *K. Djenab*[6]) nachgewiesen haben — durch ein in den Hefen anwesendes Ferment — die Saccharophosphatase — zerlegt. Die Saccharophosphatase findet sich sowohl in ober- als auch in untergärigen Hefen vor; eine Verbreitung der Saccharophosphatase bei den höheren Pflanzen wurde von *A. Nemec* und *F. Duchon*[7]) gezeigt. Die Saccharosephosphorsäure

---

[1]) *C. Neuberg* und *W. Örtel*, diese Zeitschr. **60**, 491, 1914.
[2]) *C. Neuberg* und *L. Karczag*, ebendaselbst **36**, 641, 1911.
[3]) *Grosser* und *Hussler*, ebendaselbst **39**, 1, 1912.
[4]) *E. Forrai*, ebendaselbst **142**, 282, 1923.
[5]) *C. Neuberg* und *H. Pollak*, ebendaselbst **23**, 515; **26**, 514, 1910.
[6]) *C. Neuberg* und *K. Djenab*, ebendaselbst **82**, 371, 1917.
[7]) *A. Nemec* und *F. Duchon*, ebendaselbst **119**, 73, 1921.

wird im Gegensatz zur Hexosediphosphorsäure auch von normalen, frischen Hefezellen zersetzt.

Die Saccharophosphatase der tierischen Organe ist von *Tomita*[1]) untersucht worden. Er fand, daß die Niere, Leber, Milz, Pankreas, Gehirn und Muskulatur eine Spaltung der Saccharosephosphorsäure zeigten. In der oben angeführten Reihenfolge nimmt die Spaltungsstärke ab. Es wurden Rinder-, Schweine- und Kaninchenorgane untersucht. Es zeigte sich, daß ein und dasselbe Organ verschiedener Tierarten nicht sehr ungleiche Werte für den Gehalt an Saccharophosphatase lieferte. *Tomita* zeigte auch, daß die Saccharophosphatase der Tierorgane ein von den lebenden Zellen abtrennbares Enzym ist. Er konstatierte, daß das Natrium sowie das Calciumsalz gespalten wird. Aus seinen Kontrollversuchen geht hervor, daß die Saccharosephosphorsäure in wässeriger Lösung vollkommen beständig ist, was ich nach meinen Versuchen vollständig bestätigen kann.

Die Anwesenheit der Saccharophosphatase in festen menschlichen Organen wurde meines Wissens noch nicht geprüft. Es wurde von mir untersucht, ob einige menschliche Organpulver die Saccharosephosphorsäure enzymatisch spalten. Es wurde *Mercks* Hesperonalnatrium in 0,5proz. Lösung verwendet. Es wurden stets 0,5 g Organpulver in 100 ccm der Lösung bei 37° C untersucht. Die Proben wurden 48 Stunden im Thermostaten gelassen. Die Untersuchungen — und zwar die Bestimmung der Menge der abgespaltenen Phosphorsäure — wurden in derselben Weise ausgeführt, wie dies bei den Untersuchungen bezüglich der Glycerophosphatase in menschlichen Organen bereits geschildert ist. Zum Teil aus denselben Gründen wie bei *Tomita*, „um die Versuchsanordnung nicht zu komplizieren", wurde die Einwirkung des Ferments im natürlichen Medium ohne Zusatz von Puffern untersucht.

Die untersuchten Organpulver waren die folgenden: Niere, Leberkrebs, Hoden, Nebenniere, Herzmuskel, Milzmetastase eines Magenkrebses, Metastase eines Gebärmutterkrebses am Omentum, Schilddrüse, normaler Muskel (Ileopsoas), Muskel (Ileopsoas) aus einem Falle von Eklampsie, normales Blutserum, Blutserum eines Carcinomatösen, Pankreas.

Die Versuchsergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle derart geordnet, daß die Mengen des $Mg_2P_2O_7$ die Mittelwerte der mit je zwei Proben durchgeführten insgesamt vier parallelen Untersuchungen bedeuten. Die Numerierung der Organe ist dieselbe, wie bei den bisher veröffentlichten Untersuchungen über die Glycerophosphatase.

[1]) *M. Tomita*, diese Zeitschr. **131**, 160, 1922.

Nummer des Organs	Untersuchtes Organ	Zur Bestimmung angewandte Menge	$Mg_2P_2O_7$ g a Aktiv	$Mg_2P_2O_7$ g c Autolyse	Unterschied a bis c umgerechnet auf 100 ccm	Zersetzte Saccharosephosphorsäure Proz.
1	Niere	15	0,0061	0,0059	—	—
2	Leberkrebs . .	15	0,0073	0,0032	0,0273	22,94
3	Hoden	20	0,0067	0,0061	—	—
4	Nebenniere . .	15	0,0097	0,0064	0,0220	18,92
5	Herzmuskel . .	20	0,0059	0,0064	—	—
6	Milzmetastase eines Magenkrebses . . .	20	0,0082	0,0042	0,0200	16,81
7	Metastase eines Gebärmutterkrebses . . .	20	0,0061	0,0043	0,0095	7,98
8	Schilddrüse . .	20	0,0048	0,0038	—	—
9	Muskel (Ileopsoas) normal	20	0,0061	0,0063	—	—
10	Muskel (Ileopsoas Eklampsie) . .	20	0,0059	0,0058	—	—
11	Blutserum (normal) . .	20	0,0049	0,0037	—	—
12	Blutserum (Karzinomfall)	20	0,0040	0,0037	—	—
13	Pankreas . . .	20	0,0078	0,0046	0,0160	13,44

Wie aus der vorstehenden Tabelle ersichtlich ist, zeigten unter den gewählten Versuchsbedingungen überhaupt nur Pankreas und Nebenniere sowie die krebsigen Organe eine Abspaltung von Phosphorsäure aus der Saccharosephosphorsäure. Die maximale Spaltung (22,94 Proz.) zeigt ein hepatozellulärer Leberkrebs. Es scheint daher wahrscheinlich zu sein, daß das Carcinom Saccharosephosphorsäure enzymatisch zerlegen kann. Mit Ausnahme der Nebenniere und Pankreas zeigten die übrigen Organe kaum eine merkliche Spaltung. Wie das Spaltungsvermögen dieser speziell im Kohlenhydrathaushalt eine so wichtige Rolle spielenden innersekretorischen Organe zu deuten wäre, ist fraglich.

Die Adsorption der Aminosäuren durch tierische Gewebe.

Von

W. Moeller, Altona-Bahrenfeld.

(Eingegangen am 10. November 1923.)

Die Adsorptionserscheinungen von Aminosäuren, Polypeptiden durch Tierkohle sind Gegenstand umfangreicher Untersuchungen von *Abderhalden* und *Fodor*[1]) gewesen, die feststellten, daß diese Vorgänge unter entsprechend gewählten Vorbedingungen dem Massenwirkungsgesetz bzw. dem Verteilungsgesetz folgen. Im übrigen vertreten die genannten Forscher die Ansicht, daß die Adsorption durch Kohle chemischen Kräften zuzuschreiben ist. Über die Möglichkeit der Adsorption von Aminosäuren bzw. von Eiweißabbauprodukten durch fremde oder ihre eigenen Ursprungselemente in Form von tierischen Geweben war bis vor kurzem noch nichts bekannt.

Vor mehreren Jahren hatte ich zum Zwecke der Aufklärung der Beziehungen dieser *Abbauprodukte* und deren Aminosäuren zu den *Aufbauprodukten*, und zwar den tierischen Bindegeweben, umfangreiche Arbeiten in Angriff genommen, die mit Rücksicht auf ihre Bedeutung für die Aufklärung des technischen Gerbe- und Färbeprozesses in der Fachzeitschrift „Collegium"[2]) erschienen waren. Die Fortsetzungen von diesen Arbeiten unter Anwendung von Gelatine als Adsorbens[3]) erschienen in einer anderen Zeitschrift mit gleichen Zielen. Die Wichtigkeit dieser Vorgänge der Adsorption von Aminosäuren durch das tierische Bindegewebe ist auch ganz besonders für einen Vorbereitungsprozeß des tierischen Bindegewebes zur Gerbung von Bedeutung, der gerade auch in inniger Beziehung zu dem Fermentproblem steht, das in den vorerwähnten Arbeiten von *Abderhalden* und *Fodor* eine umfangreiche Bearbeitung erfahren hat. Es ist das die Manipulation des Äscherns und Beizens der tierischen Haut zur Vorbereitung zur Gerbung, die unter beträchtlichem Abbau chemischer und bakterieller bzw.

---

[1]) Dr. *Andor Fodor*, Das Fermentproblem. Leipzig, Verlag Theodor Steinkopf, 1922.

[2]) Die Beziehungen zwischen Hydrolyse und Adsorption. Collegium, Zentralorgan des Internationalen Vereins der Lederindustrie-Chemiker, 1920, Nr. 599, 600, 601, 602, 603 und 604. (Sonderabdruck: Verlag Otto Meissner, Hamburg.)

[3]) Zeitschr. f. Leder u. Gerbereichem. 1, 125 und 183, 1922.

fermentativer Natur erfolgt, bis zu den letzten Bausteinen, den Aminosäuren herunter und sogar noch darüber hinaus unter oxydativer und reduktiver Zersetzung dieser Aminosäuren. Bei diesen Abbauprodukten war die Erscheinung zu beobachten, daß die so behandelte tierische Haut stets an das Wasser ganz bestimmte Mengen hydrolytischer Bestandteile abgab, und zwar niemals restlos, sondern bei Wiederholung des Vorganges tritt fortgesetzt Hydrolyse ein. Es bestand daher die Vermutung, daß die intakten Bestandteile der tierischen Haut sehr energisch die eigenen Abbauprodukte, besonders aber die Aminosäuren festhalten, und daß sich die Abbauprodukte und Aminosäuren lediglich in dem Maße von den intakten Bestandteilen abtrennen, als wiederum erneute Hydrolyse durch die Einwirkung der in der Haut vorhandenen Fermente stattfindet.

Im Zusammenhang mit den weiter unten zu gebenden Erklärungen über die Auffassung der Vorgänge muß hier kurz bemerkt werden, daß ich mich mit Bezug auf die Auffassung über die Zusammensetzung der Gewebselemente des Bindegewebes auf den Boden der *v. Nägeli*schen Mizellarhypothese[1]) stelle, wonach die ultramikroskopisch feinen Fibrillen der Bindegewebsfaser aus ultramikroskopisch kristallinischen Micellen bestehen, die kettenartig aneinander gereiht sind. Beim Zerfall durch Einwirkung der Chemikalien oder Fermente geht der Abbau bis zu den Aminosäuren herunter vor sich. In der ersten Arbeit über die Beziehungen zwischen Hydrolyse und Adsorption bearbeitete ich die Einwirkung der Säuren und Alkalien auf das Bindegewebe, und zwar unter eingehender Berücksichtigung des Zeitfaktors bei der Adsorption, um die bei der Hydrolyse entstehenden Abbauprodukte in ihrer Wirkung auf das angewandte Adsorptionsmittel zu verfolgen. Dabei wurden die folgenden Feststellungen gemacht:

1. Die Einwirkung von Säuren auf das Bindegewebe ist in erster Linie und schon sofort bei Berührung und Beginn der Einwirkung der Säure ein hydrolytischer Vorgang.

2. Die Hydrolyse verläuft in anorganischen Säuren erheblich schneller und stärker als in organischen Säuren.

3. Durch die Anwesenheit von Neutralsalzen wird im ersten Stadium nach 24stündiger Einwirkung der Säure die Hydrolyse scheinbar gehemmt, um dann sehr plötzlich und in starkem Maße einzutreten.

4. Neben diesen Vorgängen der Hydrolyse gehen Adsorptionserscheinungen einher, und zwar zwischen den nicht hydrolysierten Eiweißmicellen und den Produkten der Hydrolyse mit und ohne Verbindung mit Säureionen und ionisierten und nicht ionisierten Eiweißmolekülen.

---

[1]) Theorie der Gärung, S. 105. München 1879.

5. Die nebenher verlaufene Quellungserscheinung ist auf Volumvermehrung des Micellenverbandes der von den intakt gebliebenen Eiweißmicellen der Hautsubstanz adsorbierten hydratisierten Eiweißionen zurückzuführen.

6. Durch Zusatz von Neutralsalzen werden die hydratisierten hydrolysierten Eiweißionen der Lösung dehydratisiert und können demnach keine Quellungserscheinungen trotz erfolgter Adsorption hervorrufen.

7. Durch Einwirkung von Ampholyten auf das Hautpulver wird die Hydrolyse scheinbar gehemmt, und es fehlt in der Lösung derjenige Stickstoffgehalt, welcher dem in wässeriger Lösung hydrolysierten Anteil des Hautpulvers ungefähr entsprechen würde.

8. Die durch Titration schon nach einstündiger Einwirkung der Säure auf das Hautpulver bei verschiedenen Indikatoren erhaltenen scheinbaren Aciditätswerte weichen von der aktuellen Acidität infolge des sogenannten Eiweißfehlers erheblich ab und geben kein Bild über den wahren Verlauf des Vorganges.

9. Die mit Gelatine als Versuchsmaterial bei den gleichen Experimenten zu erwartenden Resultate werden voraussichtlich beträchtliche Unterschiede gegenüber denjenigen mit Hautpulver erhaltenen Ergebnissen zeigen, die auf die strukturellen und chemischen Unterschiede der Gelatine von dem Hautpulver zurückzuführen sind.

Inzwischen sind nun von *Sbarsky*[1]) und seinen Mitarbeitern in neuerer Zeit verschiedene Arbeiten veröffentlicht, die die gleiche Beobachtung der Adsorption von Eiweißabbauprodukten bzw. Aminosäuren durch die Gewebselemente des Blutes bestätigen. Die wichtigste Beobachtung bei den Versuchen des vorerwähnten Forschers war die Tatsache, daß die Abbauprodukte durch die Gewebselemente des Blutes so festgelegt wurden, daß sie chemisch nicht mehr nachweisbar waren, sondern erst nach dem Kochen des Blutes wurden diese wieder abgegeben. Diese Beobachtungen sind von erheblicher Bedeutung für die biologischen bzw. toxikologischen Vorgänge. Im Zusammenhang mit diesen Arbeiten über die Beziehungen zwischen Hydrolyse und Adsorption ist eine ganz kürzlich erschienene Arbeit von *Zelinsky* und *Ssadikow*[2]) „Über Peptisation der Aminosäuren unter der Einwirkung von Säuren und Alkalien“ von Bedeutung, wonach die bisher übliche Anschauung umgestoßen wird, daß die Aminosäuren gegenüber Säuren und Alkalien völlig indifferent sind, und demnach die Hydrolyse der Eiweißkörper mittels Alkalien und Säuren zu Produkten führen soll,

---

[1]) Diese Zeitschr. **135**, 21, 1923; II. Mitteilung ebendaselbst **141**, 33; III. Mitteilung ebendaselbst **141**, 37, 1923.

[2]) Ebendaselbst **141**, 97, 1923.

die ursprünglich im Eiweißkörper präformiert sind. Durch die Arbeiten der genannten Forscher wird diese geltende Meinung über die Indifferenz von Aminosäuren hydrolysierenden Agenzien gegenüber widerlegt und die Möglichkeit der Kondensation und Komplexierung von Aminosäuren bei „kalter Hydrolyse" nachgewiesen. Dadurch werden die von mir in der ersten Arbeit über die Beziehungen zwischen Hydrolyse und Adsorption gezogenen Schlußfolgerungen etwas zu modifizieren sein, während die experimentellen Befunde als solche völlig mit diesen Anschauungen übereinstimmen. Die Erklärung für die sogenannte Rückwärtsadsorption der Abbauprodukte der Haut durch die intakten Gewebselemente ist vielmehr auf Grund der Versuche von *Zelinsky* und *Ssadikow* dahingehend zu geben, daß nach gewisser Einwirkungsdauer der Säuren und Alkalien eine Kondensation und Komplexierung der in der Außenflüssigkeit befindlichen Abbauprodukte und Aminosäuren stattfindet, die nunmehr als kolloide, hochkomplexe Verbindungen wiederum von den intakten Teilen der Hautmicellen adsorbiert werden, wobei als bewegende Kraft für die Adsorption die in der Lösung befindlichen Wasserstoffionen, die in Verbindung mit den neu gebildeten Komplexen treten, anzusehen sind. Es lag nun nahe, die oben erwähnten Tatsachen der Adsorption einer reinen Aminosäure ohne Zusatz von Säuren und Alkalien mit Bezug auf Adsorptionskraft gegenüber den Hautelementen zu untersuchen, um die individuellen Eigenschaften einzelner Aminosäuren gegenüber dem Ursprungskörper mit Bezug auf Anlagerungsmöglichkeit festzustellen. Am zweckmäßigsten eignen sich hierzu die Aminosäuren mit deutlich saurem Charakter, besonders der aromatischen Klasse, wie z. B. Tyrosin und Phenylalanin, wenngleich das Tyrosin bei seiner beschränkten Wasserlöslichkeit nur in verdünntem Zustande verwendbar ist. Als Adsorbens für die vorliegenden Versuche wurde sogenanntes Analysenhautpulver verwendet, wie es für wissenschaftliche und analytische Versuche auf dem Bindegewebe der tierischen Haut nach Entfernung der Epidermishaare und unter beträchtlichem hydrolytischen und fermentativen Abbau durch Trocknen und Vermahlen hergestellt wird. In diesem Zustande stellt das Produkt eine weiße faserige Masse von wolligem Charakter dar, welche große Ähnlichkeit mit der sogenannten gewachsenen Tonerde von *Wislicenus*[1]) besitzt, der dieses letztere Material zu Analogieversuchen gegenüber dem Hautpulver benutzte. Als Adsorber kam die eine der oben erwähnten beiden Aminosäuren der aromatischen Gruppe, nämlich das Tyrosin, zur Verwendung. Es genügt nicht, daß man, wie ich bei meinen ersten grundlegenden Versuchen

[1]) Kolloidzeitschr. **27**, 209, 1920; vgl. ferner *Zehmen*, ebendaselbst **27**, 235, 1920.

und auch wie einige der oben genannten Forscher, die sich mit dem gleichen Gegenstand beschäftigten, verfahren haben, ein Gemenge verschiedener Abbauprodukte und Aminosäuren auf das Adsorbens einwirken läßt, weil in einem undefinierbaren Gemisch zahlreicher Aminosäuren oder anderer Abbauprodukte sich möglicherweise die Aminosäuren mit amphoterem Charakter und diejenigen mit deutlich saurem Charakter kompensieren und dadurch den Nachweis der Adsorptionsvorgänge bei dem einen oder anderen Bestandteil des Gesamtkomplexes unmöglich machen. Zweifellos werden sich Abbauprodukte, die von einem bestimmten Eiweißkörper herrühren, ganz anders gegenüber einem anderen Eiweißkörper verhalten, der zu einer anderen Gruppe gehört. Ganz besonders wird dieses der Fall sein bei jener großen Klasse von Eiweißkörpern, die man früher zu den sogenannten unechten Eiweißkörpern zählte, gegenüber den echten Eiweißkörpern. Diese letztere Klasse enthält bekanntlich das Tyrosin, welches Gegenstand der vorliegenden Untersuchung ist, in beträchtlicher Menge.

Im Gegensatz zu der Hauptaminosäure der Eiweißsubstanz, dem Glykokoll, welches amphoter ist, ist das Tyrosin sauren Charakters und wirkt ähnlich wie schwache Säuren auf die intakten Kollagenfasern des Hautpulvers. Um die tatsächlichen Vorgänge genau zu untersuchen, wäre es daher notwendig, das Verhalten von Glykokoll auf die Kollagenfasern zu prüfen. In einer grundlegenden Arbeit über die „Beziehungen zwischen Hydrolyse und Adsorption“[1]) hatte ich gefunden, daß Glykokoll als amphoterer Körper auf das ebenfalls amphotere Kollagen in Form von Hautpulver gar nicht einwirkt und man bei Einwirkung von Glykokollösungen auf Hautpulver in der Lösung stets fast genau dieselbe Menge von Glykokoll wiederfindet, selbst nach längerer Einwirkungsdauer, wie man angewandt hat. Ganz anders verhält sich aber eine Lösung von Tyrosin gegenüber dem Hautpulver. Zum Zwecke der Feststellung dieses Verhaltens wurde folgender Versuch ausgeführt:

Eine Lösung von Tyrosin von 0,7 Proz. ließ man im großen Volumen von 1000 ccm auf stets die gleiche Menge Hautpulver von 4,4 g einwirken. Das Tyrosin ist sehr schwer löslich, und wie durch einen Versuch festgestellt wurde, beträgt die Löslichkeit in kaltem Wasser fast genau so viel wie in heißem Wasser. Die Lösung wurde in der Weise hergestellt, daß ein Überschuß von Tyrosin mit etwas mehr als 1 Liter destillierten Wassers mehrere Tage stehengelassen wurde, bis die Lösung gesättigt ist. Von dem ungelösten Tyrosin wurde abfiltriert und hiervon 950 ccm Tyrosinlösung abgemessen. Die 4,4 g

[1]) Die Beziehungen zwischen Hydrolyse und Adsorption. Collegium 1920, Nr. 599—604. (Sonderabdruck: Verlag Otto Meissner, Hamburg.)

Hautpulver wurden mit 50 ccm Wasser quellen gelassen und alsdann die 950 ccm zugegeben, so daß zusammen ein Volumen von 1000 ccm vorlag. Für jedes Zeitintervall, welches auf 2, 4, 6, 8 und 10 Tage ausgedehnt wurde, ist ein besonderes Versuchsquantum von 1 Liter angesetzt worden. Die tatsächlich vorhandene Tyrosinmenge in der Lösung selbst wurde durch Stickstoffbestimmung ermittelt. Diese ergab 9,82 Proz. Stickstoff, daher 1 g Stickstoff = 10,18 Tyrosin. Die Stickstoffbestimmung wurde nach *Kjeldahl* ausgeführt. Theoretisch enthält das Tyrosin auf Grund der Formel

```
          (OH)
           C
       HC//\CH
        |    ||
       HC\  /CH
           C . CH2 . CH(NH2) . COOH
```

nur 7,73 Stickstoff, jedoch ist es sehr schwer, chemisch reines Tyrosin zu erhalten, und das verwendete Produkt hatte tatsächlich auf Grund zahlreicher Stickstoffbestimmungen 9,82 Proz. Stickstoff. Die Lösungen wurden außerdem, um Fäulniserscheinungen vorzubeugen, mit Chloroform sterilisiert. Nach den verschiedenen Zeitintervallen wurden die Lösungen filtriert und im Filtrat wiederum der Stickstoff nach *Kjeldahl* bestimmt. Von diesem Stickstoff wurde der proteolytische Faktor des Hautpulvers, der 1,75 betrug, in Abzug gebracht, und zwar als feststehender Wert für alle Zeitintervalle gleichmäßig. Die Resultate waren folgende:

Ansatz	Einwirkungsdauer	g N in 1000 ccm Filtrat	g N in 950 ccm angew. Lösg.	Differenz	Tyrosin g	Proz.
4,4 g Hautpulver	2 Tage	0,6095	0,6078	— 0,0017	—	—
+ 50 ccm H_2O	4 „	0,6039	0,6078	— 0,0039	= 0,0397	0,90
+ 950 ccm	6 „	0,5395	0,6078	— 0,0683	= 0,6953	15,80
Tyrosinlösung	8 „	0,4569	0,6078	— 0,1509	= 1,5360	34,91
	10 „	0,4116	0,6078	— 0,1962	= 1,9970	45,39

Wie daraus ersichtlich, ist nach zweitägiger Einwirkung des Tyrosins auf das Hautpulver der Wert praktisch gleich. Nach viertägiger Einwirkung ist eine sehr geringe Adsorption des Tyrosins durch das kollagene Hautpulver festzustellen; nach sechstägiger Einwirkung tritt eine starke Aufnahme ein, die sich fortgesetzt nach acht- und zehntägiger Einwirkung steigert bis zu dem enormen Betrage von 45,4 Proz. Es ist zweifellos, daß bei weiterer längerer Einwirkung die Adsorption noch weiter fortschreitet, und folgt dieselbe jedenfalls bei längerer Einwirkung des Tyrosins auf das Hautpulver den Adsorptionsgesetzen.

Schlußfolgerungen.

Aus diesen einfachen Versuchen unter Verfolgung der Stickstoffbilanz ist zunächst erwiesen, daß das amphotere Hautpulver aus einer Lösung von Tyrosin dieses in beträchtlichem Maße adsorbiert, wobei gleichzeitig die Hydrolyse des intakten Eiweißkomplexes selbst zum Stillstand kommt. Gleichzeitig erhält dann auch das amphotere Eiweißprodukt des Bindegewebes einen anderen Charakter unter Aufnahme aromatischer Komplexe. Diese Vorgänge eröffnen vielerlei Möglichkeiten für die Bildung von sogenannten echten Eiweißkörpern unter Zugrundelegung eines Grundkörpers, wie etwa einer Bindegewebssubstanz oder deren teilweisem Abbauprodukt, der Gelatine, die man sich aus dem Bindegewebe unter ganz beträchtlichem Zerfall zahlreicher Micellen und Peptisation des Restes der intakten Kollagenmicellen entstanden denken kann. Beim biologischen Aufbau der Eiweißbestandteile spielen demnach Adsorptionsvorgänge anscheinend eine beträchtliche Rolle, und zwar nicht nur unter gleichzeitiger Kondensation und Komplexbildung, sondern auch durch Adsorption einfacher Bausteine, besonders der aromatischen Gruppe, wie Tyrosin und Phenylalanin. Dadurch können aus einem deutlich amphoteren Eiweißgrundkörper, wie z. B. Kollagen, durch Aufnahme von diesen Aminosäuren der aromatischen Gruppe alle diejenigen Eiweißsubstanzen gebildet werden, die in beträchtlichem Maße die Aminosäuren der aromatischen Gruppe enthalten.

Über die Sedimentierung von Hefesuspensionen.

Von

L. Berczeller und H. Wastl.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Wien.)

(Eingegangen am 10. November 1923.)

Die in den letzten Jahren ausgeführten Untersuchungen über die Senkung der roten Blutkörperchen haben bewiesen, daß dieser Vorgang von sehr vielen mechanischen, physikalisch-chemischen, chemischen und biologischen Faktoren der Versuchsbedingungen abhängig ist. In einer vorangehenden Arbeit[1]) haben wir zeigen können, daß man die Erklärung des Vorganges auch unter den einfachsten Bedingungen nicht aus der Bewegung eines Einzelteilchens wird geben können, wie sich dies in der *Stokes*schen Formel für mechanisch einfachere Arten der Sedimentierung ergibt. Aus diesen Gründen scheint es zweckmäßig, die Sedimentierung der roten Blutkörperchen mit möglichst ähnlichen Suspensionen[2]) zu vergleichen; dazu eignet sich Hefe besonders gut, da die Hefezellen von ziemlich gleicher Größe und spezifischem Gewicht, dabei aber von wesentlich anderer Gestalt sind als die roten Blutkörperchen.

Die Versuche wurden in ganz ähnlicher Weise ausgeführt wie unsere bisher publizierten[1]) Senkungsversuche mit Blut. Es wurde eine 40proz. Hefeemulsion in destilliertem Wasser (oder Plasma usw.) hergestellt und die Senkung bei 130 mm hoher Flüssigkeitssäule in 2 mm weiten Röhrchen untersucht. Wie in den Blutsenkungsversuchen haben wir die Senkung auch neben 90^0 an schiefen Ebenen (67,5, 45 und $22,5^0$) untersucht.

Unter diesen Bedingungen ist die Senkung bei Hefe in den vertikalen Röhren eine ganz minimale. Wie aus Tabelle I ersichtlich, ist die Senkung nach 100 Minuten noch 0. Obzwar die Hefezellen größer sind

---

[1]) Diese Zeitschr. 1923.

[2]) Hämatococcus pluvialis, der in seiner Systemform eventuell auch als Modellversuch in Betracht käme, läßt sich, wie sich gezeigt hat, nicht so rein sammeln, um einwandfreie Sedimentierungsversuche damit anstellen zu können.

als die roten Blutkörperchen (es wäre also eine schnellere Senkung bei ihnen zu erwarten), ist die Senkung auch bei Blutkörperchen, die in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und in ihr in 40proz. Suspension aufgeschwemmt wurden, regelmäßig eine schnellere, nur die ganz langsam senkenden Blutarten, wie z. B. menschliches Nabelschnurblut, zeigen unter den angegebenen Verhältnissen eine den Hefezellen entsprechende minimale Senkung.

In Tabelle I sind die Senkungsgeschwindigkeiten einiger in physiologischer Kochsalzlösung suspendierter roter Blutkörperchenproben, ferner die eines sehr schnell sinkenden Pferdeblutes (in Plasma und Serum) und eine Hammel- und Rinderblutprobe in Serum suspendiert angegeben. Bei den langsam sinkenden Blutproben ist die Senkung in Gegenwart von Serum geringer als in physiologischer Kochsalzlösung, wogegen beim Pferdeblut auch das Serum eine Beschleunigung der Senkung hervorruft; denn eben die Pferdeblutkörperchen zeigen in physiologischer Kochsalzlösung eine besonders ausgesprochene Verlangsamung der Senkung [s. auch *Krüger*[1])].

Tabelle I. Senkung bei 90°.

Konzentration der Suspensionen: 40 Teile körperliche Elemente zu 60 Teilen Flüssigkeit.

Zeit in Minuten	Hefesuspension in dest. Wasser	Nabelschnurblut in physiolog. NaCl	Hammelblut in physiolog. NaCl	Kaninchenblut in physiolog. NaCl	Hundeblut in physiolog. NaCl	Pferdeblut in physiolog. NaCl	Pferdeblut in Plasma	Hammelblut	Rinderblut	Pferdeblut
								defibriniert		
20	0	0	0	0	0,25	0	8,0	0	0	2
40	0	0	0,50	0,50	0,50	0	35,50	0,20	0	6
100	0	0	0,75	0,75	3,00	0,20	53,00	0,25	0	26
180	0,20	0	1,00		3,00	0,50	58,00	0,50	0,25	35
260		0				0,75	60,00		0,25	41
1000	3,80		1,50	11,00	38,00		62,00	2,50	0,25	
1580		1,00	9,00					5,50		
2600		1,50	16,00					8,00		

Dieser überaus große Unterschied im Ablauf der Senkung der Hefezellen und Pferdeblutkörperchen, wenn sie in Wasser bzw. in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert sind, gegenüber dem Senkungsverlauf, wenn die Pferdeblutkörperchen im Plasma oder Serum aufgeschwemmt sind, gibt uns einen Weg an, um die Wirkung des Serums bzw. Plasmas bei der Senkung näher zu untersuchen. Zu diesem Zwecke haben wir die Hefesuspensionen einerseits in Pferdeplasma und -serum, andererseits in Hammelserum hergestellt.

[1]) Zeitschr. f. Biol. 79, 145ff., 1923.

Tabelle II. Sedimentierung von Hefesuspensionen in Pferdeplasma bzw. -serum (40proz. Suspension).

Zeit in Min.	90° Plasma Citrat	90° Plasma Oxalat	90° Plasma melaninsaures Na	90° Serum, defibriniert	90° Wasser	67,5° Plasma Citrat	67,5° Plasma Oxalat	67,5° Plasma melaninsaures Na	67,5° Serum, defibriniert	67,5° Wasser	45° Plasma Citrat	45° Plasma Oxalat	45° Plasma melaninsaures Na	45° Serum, defibriniert	45° Wasser	22,5° Plasma Citrat	22,5° Plasma Oxalat	22,5° Plasma melaninsaures Na	22,5° Serum, defibriniert	22,5° Wasser
20	0,20	0	0	0,20	0	0,20	0	0,25	0,25	1,25	0,50	0,50	1,50	2,00	4,50	0,75	0,50	2,00	2,25	6,00
40	0,20	0	0,20	0,25	0	0,50	0,50	0,75	0,75	4,50	4,00	2,25	4,00	5,00	11,00	6,00	4,00	6,00	7,00	15,00
100	0,20	0,20	0,20	0,25	0	5,00	4,00	6,50	6,00	12,00	12,00	10,00	13,00	16,00	24,00	21,00	15,00	25,00	20,00	34,00
180	0,25	0,50	0,50	0,50	0,20	11,00	8,00	13,00	11,00	18,00	20,00	17,50	23,00	25,00	33,50	36,00	27,00	40,00	32,00	45,00
1000	4,00	3,50	3,50	4,00	4,00	39,00	33,00	38,00	38,00	45,00	51,00	47,00	55,00	54,00	53,00	61,00	53,00	61,00	57,00	57,00

Tabelle III. Sedimentierung von ♀ Pferdeblut (Ablesung in mm freier Flüssigkeitshöhen).

Zeit in Min.	90° Plasma Citrat[1]	90° Plasma Oxalat[2]	90° Plasma melaninsaures Na[3]	90° Serum, defibriniert	67,5° Plasma Citrat[1]	67,5° Plasma Oxalat[2]	67,5° Plasma melaninsaures Na[3]	67,5° Serum, defibriniert	45° Plasma Citrat[1]	45° Plasma Oxalat[2]	45° Plasma melaninsaures Na[3]	45° Serum, defibriniert	22,5° Plasma Citrat[1]	22,5° Plasma Oxalat[2]	22,5° Plasma melaninsaures Na[3]	22,5° Serum, defibriniert
10	1,00	1,50	0,75	0,75	3,50	5,00	2,00	1,25	8,00	11,00	8,50	3,00	10,00	10,00	5,00	3,00
15	1,25	3,00	1,50	1,00	11,00	15,00	7,00	3,25	18,00	22,00	19,00	6,00	21,00	23,00	16,00	6,50
20	1,50	8,00	3,00	2,00	16,5	22,00	17,00	5,50	23,50	29,00	27,00	10,00	30,00	32,00	25,00	11,00
30	2,25	25,50	5,00	3,50	27,00	31,50	26,00	11,00	37,00	38,00	34,00	18,00	42,00	42,00	35,00	20,00
40	3,50	35,50	13,50	6,00	36,00	37,00	31,50	15,50	44,00	43,00	39,50	25,00	48,00	47,00	40,00	26,00
60	9,00	46,00	20,00	14,00	45,00	45,50	28,60	24,00	51,00	49,00	46,00	33,00	55,00	51,00	46,50	35,00
80	26,00	51,00	37,00	22,00	51,00	50,00	42,00	29,00	55,00	52,00	49,00	37,50	58,00	55,00	50,00	39,00
120	40,00	55,00	43,00	31,00	57,50	55,00	47,00	35,00	62,00	61,00	54,00	43,00	62,00	58,00	54,00	45,00
270	51,00	60,00	51,00	41,00	64,00	60,00	53,00	44,00	66,00	62,00	58,00	50,00	67,00	62,00	59,00	53,00
430	57,00	62,00	54,00	45,00	66,00	62,00	56,00	48,00	68,00	63,00	60,00	54,00	69,00	63,00	61,00	56,00

[1]) Zusatz von 4 ccm einer 20proz. Na-Citratlösung auf 100 ccm Blut. — [2]) Zusatz von 4 ccm einer konz. Na-Oxalatlösung auf 100 ccm Blut. — [3]) Zusatz von 4 ccm einer 3proz. Lösung von melaninsaurem Na auf 100 ccm Blut

In Tabelle II ist die Senkung von Hefesuspensionen (40 Proz.) in auf verschiedene Weise gewonnenen Plasmen und in Serum angegeben, in Tabelle III sind die mit entsprechenden Blutproben (weibliches Pferdeblut) erhaltenen Werte angeführt.

Tabelle II zeigt, daß die Senkung der Hefe sowohl im Pferdeplasma wie im Pferdeserum nicht diese größeren Geschwindigkeiten der Senkung aufweist, wie dies bei den Pferdeblutkörperchen zur Beobachtung kommt. Die Senkungshöhen sind bei 90° viel zu gering, als daß man einen genauen Vergleich der Resultate durchführen könnte. Aus diesem Grunde haben wir die Senkung der Hefesuspensionen auch in den schief gestellten Röhren untersucht. Die Senkung der Hefesuspensionen findet in diesen in ganz ähnlicher Weise wie beim Blute schneller statt, und zwar ist die Senkung eine um so schnellere, je schiefer die Röhren gestellt sind.

Aus Tabelle II ist auch ersichtlich, daß die Senkung der Hefesuspensionen durch Pferdeplasma und Pferdeserum gegenüber Wasser regelmäßig verlangsamt wird (abgesehen von 90°, wo die absoluten Senkungshöhen ganz minimale sind). Es ist die Wirkung des Serums und Plasmas auf Hefezellen eben entgegengesetzt wie auf die roten Blutkörperchen (s. Tabelle III). Diese Abnahme der Senkungsgeschwindigkeit der Hefezellen entspricht der höheren Viskosität des Plasmas und Serums. Damit haben wir eine empfindliche und einfache Methode in der Hand, um die spezifischen Wirkungen des Plasmas auf die roten Blutkörperchen und die unspezifischen auf die Sedimentierung unterscheiden zu können, was um so wichtiger ist, da Pferdeplasma auch auf andere rote Blutkörperchen einen beschleunigenden Einfluß ausübt, wenn auch diese Wirkung auf die Blutkörperchen anderer Tierarten keine so große ist wie auf die eigenen.

Tabelle IV.

40proz. Hefesuspension in Hammelserum.

Zeit in Minuten	90°		67,5°		45°		22,5°	
	Destill. Wasser	Hammelserum	Destill. Wasser	Hammelserum	Destill. Wasser	Hammelserum	Destill. Wasser	Hammelserum
30	0,25	0	5,50	1,50	14,00	3,50	17,00	5,00
65	0,50	0,25	10,00	4,50	23,00	8,50	28,00	13,00
150	1,50	1,00	18,00	13,00	34,00	23,00	40,00	36,00
230	2,00	1,50	26,00	21,00	44,00	38,00	50,50	—
820	8,00	2,00	46,00	38,00	56,00	52,00	56,00	60,00

In Tabelle IV ist die Senkung einer 40proz. Hefesuspension in destilliertem Wasser bzw. Hammelserum angeführt. Im Hammelserum ist die Verlangsamung der Senkung der Hefe auch bei 90° regelmäßig nachweisbar, wenn auch in den schiefen Röhren diese Verlang-

samung schon nach viel kürzeren Zeiten als in den vertikalen Röhren nachweisbar ist.

Tabelle V.

Quotienten aus in Wasser zurückgelegten Strecken : in Serum zurückgelegten Strecken.

Zeit in Minuten	90°		67,5°		45°		22,5°	
	Serum von							
	Pferd	Hammel	Pferd	Hammel	Pferd	Hammel	Pferd	Hammel
20	0		5,0		2,3		2,7	
30		∞		3,6		4,0		3,4
40	0		6,0		2,2		2,1	
65		2,0		2,2		2,7		2,2
100	0		2,0		1,5		1,7	
150		1,5		1,5		1,5		1,1
180	0,4		1,6		1,3		1,4	
230		1,3		1,2		1,1		
820		4,0		1,2		1,1		0,9
1000	1,0		1,2		1,0		1,0	

In Tabelle V sind die Verhältniszahlen der im Wasser zurückgelegten Strecken dividiert durch die im Serum zurückgelegten Strecken (sowohl mit Pferde-, wie mit Hammelserum) angegeben. In den schiefen Röhren kann man ganz regelmäßige Veränderungen dieser Quotienten beobachten. Die senkungshemmende Wirkung der Viskosität nimmt mit der Zeit sehr stark ab, und die nachherigen Differenzen in den Quotienten sind hauptsächlich auf die im Beginn beobachtete Hemmung der Senkung durch Serum zurückzuführen.

Tabelle VI.

Geschwindigkeit der Senkung in μ pro Minute.

Zeit in Minuten	90°		67,5°		45°		22,5°	
	Serum	Wasser	Serum	Wasser	Serum	Wasser	Serum	Wasser
				Pferd				
20	10,0	0	12 5	62 5	100 0	225 0	112,5	300 0
40	2,5	0	25,0	162 5	150 0	325 0	237,5	450,0
100	0	0	87.5	125,0	150 0	216,6	216,6	316.6
180	3,1	2,5	62,0	75 0	112,5	118,7	150,0	112,5
1000	4,3	4,6	33,0	33,00	35,3	23,8	30,5	10,4
				Hammel				
30	0	8,3	50,0	183,3	116,6	466,6	166,6	566,6
65	7,1	7,1	85.9	128,5	142,8	257,1	228,5	314,2
150	8 8	12 0	100 0	44.1	158,9	129,4	270,5	141,1
230	6.2	6,2	100 0	100,0	187,5	125,0		
820	0,8	10,2	28,8	33.9	23,7	20,3		

Tabelle VIa.

Quotienten der Geschwindigkeiten: $\frac{\text{Geschwindigkeit in Wasser}}{\text{Geschwindigkeit in Serum}}$

Zeit in Minuten	90°		67,5°		45°		22,5°	
	Pferd	Hammel	Pferd	Hammel	Pferd	Hammel	Pferd	Hammel
20	0		5,0		2,3		2,7	
30		∞		3,7		4,0		3,4
40	0		6,1		2,2		1,9	
65		1,0		1,5		1,8		1,4
100	0		1,4		1,9		1,5	
150		1,3		0,9		0,8		0.5
180	0,8		1,2		1,0		0,8	
230		1,0		1,0		0,7		
820		12,0		1,1		0,9		
1000	1,1		1,0		0,7		0,5	

In Tabelle VI sind die für die einzelnen Zeitintervalle berechneten Geschwindigkeiten angegeben, in Tabelle VIa die daraus gebildeten Quotienten $\frac{\text{Wasserwerte}}{\text{Serumwerte}}$. Für den quantitativen Vergleich sind die Versuche in den schiefen Röhren geeigneter. Es zeigt sich, daß im Versuchsbeginn die Senkung der Hefezellen durch Serum gehemmt wird, später wird diese Wirkung aufgehoben, oder die Sedimentierung im Serum findet sogar etwas schneller statt. Jedenfalls beweisen die Versuche, daß die Wirkung des Pferdeserums auf die Pferdeblutkörperchen eine ganz spezifische ist, denn im Pferdeserum ist die anfängliche Verlangsamung der Hefesenkung eine noch viel größere als im Hammelserum. Dem entspricht auch, daß im Pferdeserum die verlangsamende Wirkung auch nach viel längerer Versuchsdauer nachweisbar ist als im Hammelserum (die Geschwindigkeit der Sedimentierung ist maximal das Sechsfache im Wasser von jener im Serum. Die retardierende Wirkung des Serums auf die Bewegung ist besonders im Beginn bei 67,5° am größten).

Damit ist also die Zweckmäßigkeit der Untersuchung der Senkung von Hefesuspensionen für die Unterscheidung der spezifischen Wirkungen des Plasmas auf die roten Blutkörperchen gegenüber der Wirkung der Viskosität dargetan. In der gleichen Weise läßt sich auch mit Hilfe dieses Sedimentierungsvorganges der Mechanismus der Senkung auf schiefen Ebenen wie auch der der Verdünnung als die bei der diagnostischen Untersuchung hauptsächlich in Betracht kommenden variablen Faktoren näher analysieren.

In Tabelle VII haben wir eine Reihe von solchen Versuchen zusammengestellt, bei denen die bei 67,5° zurückgelegten Wegstrecken möglichst gleich waren. Wie sich aus dieser Tabelle ergibt, differieren bei relativ geringen Senkungshöhen (also im Versuchsbeginn) die in

den angegebenen Plasmen und defibrinierten Seren ausgeführten Versuche in den zurückgelegten Wegstrecken bei den verschiedenen Winkeln nicht wesentlich voneinander, trotzdem die Versuchszeiten ganz verschieden lang sind. Bei längerer Versuchsdauer können wir aber sehr wesentliche Unterschiede in der *Senkungsweise* in den verschiedenen schiefen Ebenen beobachten in der Art, daß bei verschiedener Schiefstellung der Röhren die Abweichungen von der Senkung der Hefesuspension im Wasser sehr bedeutend werden. Insbesondere sind bei pathologischen menschlichen Blutproben sehr wesentliche Abweichungen in der Senkung zu beobachten. Dies zeigt uns,

1. daß die Veränderung der Bewegung, wenn wir die Senkung in verschieden schief gestellten Röhren untersuchen, in erster Linie nicht von der *Gestalt* der roten Blutkörperchen abhängig ist, denn Hefe und Blutkörperchen unterscheiden sich oft weniger voneinander als verschiedene Blutarten untereinander;

2. daß die Senkung der roten Blutkörperchen von verschiedenem *Bewegungstypus* sein kann. Für die Unterscheidung dieser Bewegungstypen erweist sich die Untersuchung in verschiedenen Ebenen als sehr zweckmäßig, da sich diese dadurch sehr scharf trennen lassen. So haben wir bei verschiedenen pathologischen menschlichen Blutproben beobachten können, daß die maximale Zunahme der Senkungshöhen gerade bei vertikaler Stellung vorkommen kann (Schwangerenblut, Hypertonie). Z. B. zeigt ein O_2-gesättigtes weibliches Blut eines Falles von Hypertonie in den schiefen Röhren gleiche Werte wie die Hefesuspension, dagegen ist bei 90^0 die Senkung ungefähr siebenmal schneller.

Mit diesen Versuchen ist zugleich nochmals der Beweis erbracht, daß die Klärung des Senkungsmechanismus nur von der Untersuchung der langsam senkenden, nicht agglutinierenden tierischen Blutarten oder der diesen ähnlich sich verhaltenden defibrinierten Blutproben den Ausgang nehmen kann, denn die Senkung im Plasma, besonders bei Fibrinogenvermehrung, kompliziert diesen Grundvorgang noch sehr wesentlich, indem dadurch mehrere variable Faktoren auf einmal modifizierend einwirken. Als Grundvorgang dient die Bewegung in den langsam senkenden Blutproben um so mehr, als sie in sehr ähnlicher Weise wie bei Hefe abläuft.

Durch Verdünnung der 40proz. Hefesuspensionen mit destilliertem Wasser wird ihre Senkung bedeutend beschleunigt. Auch in dieser Beziehung ist also die Senkung der Hefesuspensionen der Senkung der Blutkörperchen ähnlich, und zwar unterscheidet sich diese Beschleunigung auch quantitativ nicht von der Beschleunigung der Senkung bei Verdünnung von Blutkörperchensuspensionen, wie dies aus Tabelle VIII, wo die Senkungshöhen von Hefe und gewaschenen roten Blutkörperchen in physiologischer Kochsalzlösung angegeben

Tabelle

	Zeit in Min.	Zurückgelegte Strecken (freie Flüssigkeitshöhen) in mm				Zeit in Min.	Zurückgelegte Strecken in mm			
		90⁰	67,5⁰	45⁰	22,5⁰		90⁰	67,5⁰	45⁰	22,5⁰
Hefe in Wasser 40 Proz.	20	0	1,25	4,50	6,00	40	0	4,50	11.00	15,0
Rinderblut, defibriniert	75	0	1,25	5,00	6,00	125	0	3,50	9,00	11,5
,, ,,	145	0	1,50	4,50	6,00	185	0,25	5,50	14,00	19,0
,, ,,						325	0,25	4,00	8,50	13,5
Hammelblut, defibrin. .	120	0	1,00	3,50	6,00	360	0	5,00	10,50	19,5
,, ,, .						120	0,25	4,00	12 00	16,0
,, ,, .	60	0,20	1,25	4,00	5,50	180	0,50	5,00	12,00	17,5
,, ,, .										
Hundeblut ♂, defibrin. .						125	0	3,00	11,00	13,0
,, ♂, Oxalatbl.						30	0,75	4,00	10,00	18,5
Hundeblut ♀, defibrin. .	30	0,50	1,60	3,50	5,50	75	0,5	4,25	9,00	14,5
,, ♀, Oxalatbl.										
Kaninchenblut ♀, Oxalatblut . .						40	0,25	5.50	14,00	18,5
Katzenblut ♀, defibrin. .						20	0,50	3,00	8,50	14,0
Menschenblut ♀, Hypertonie, O_2										
Menschenblut ♀, CO_2, 48 h nach Entnahme Oxalatplasma . .										
Menschenblut ♀, O_2, 48 h nach Entnahme Oxalatplasma . .										
Schwangerenbl. Citratbl.										
Menschenbl. ♂, defibrin.	30	0,25	1,50	5,25	7,00					
Menschenblut ♀, Hypertonie, Hirudin										
Schwangerenblut (CO_2), Citratbl.										
Menschenblut ♂, Oxalatplasma (Herzfehler) .	25	0	1,00	6,00	9,00	40	0	5,00	13,00	18,0

Tabelle VIII. Sedimentierung von Hefe und gewaschenen roten Bl
(Ablesung in mm

Zeit in Min.	40 proz. Hefesuspension								Kaninch			
	90⁰		67,5⁰		45⁰		22,5⁰		90⁰		67,5⁰	
	unverdünnt	verdünnt[1])	unverdünnt	verdünnt[1])	unverdünnt	verdünnt[1])	unverdünnt	verdünnt[1])	unverdünnt	verdünnt[1])	unverdünnt	verdünnt
15									0,25	0,50	4,50	7,
20	0,25	0,50	3,50	14,00	11,00		13,00	44,00				
30									0,75	1,50	8,00	16
40	0,25	1,00	7,00	28,00	17,00	54,00	20,00	58,00				
45												
60									1,00	2,75	14,00	34
65	0,50	1,25	10,00	38,00	23,00		28,00	68,00				
75									1,25	3,00	17,00	3
90									1,25	4,00	25,50	4
210	2,00	6,00	24,00	73,00	42,00	83 00	49,00	90 00				
825	8,00	25,00	45,00	91,00	56,00	93,00	56,50	93,00				
900									60,00	91,00	65,00	9
1210	12,00	40,00	53,00	91,00	58 00	94,00	59.00	93,00				
2360	20,00	62,00	55,00	96,00	59,00	95,00	59,00	93.00				

[1]) 1 Teil 40 proz. Suspension + 1 Teil 0,9 proz. NaCl-Lösung.

II.

Zeit in Min.	Zurückgelegte Strecken in mm 90°	67,5°	45°	22,5°	Zeit in Min.	Zurückgelegte Strecken in mm 90°	67,5°	45°	22,5°	Zeit in Min.	Zurückgelegte Strecken in mm 90°	67,5°	45°	22,5°
00	0	12,00	24,00	34,00	180	0,20	18,00	33,50	45,00	1000	4,00	45,00	53,00	57,00
80	0,50	11,00	23,00	32,00										
10	1,25	13,00	24,00	36,50	2500	2,00	21,00	32,00	34,00					
40	0	10,00	22,00	34,00										
										1600	3,00	43,00	56,00	66,00
10	3.00	12,00	22,00	30,00	1210	7,00	18,00	30,00	38,00					
55	1,00	11,00	23,00	32,00										
60	1,50	13,00	21,00	33,00	105	2,00	18,00	32,00	43,00	1270	7,00	44,00	55,00	68,00
10	1,00	13,00	21,00	28,00										
00	1,25	13,00	26,00	29,00	{ 120	1,75	17,00	28,00	32,00					
					{ 180	2,00	20,00	35,00	38,00					
80	0,50	11,00	24,00	33,00	140	1,50	17,50	31,00	45,00					
					60	1,00	19,00	32,00	47,00	260	2,50	40,00	57,00	66,00
										80	27,50	43,00	55,00	58,00
					80	2,00	18,00	23,00	25,00					
					50	2,00	20,00	27,00	40,00	170	36,00	46,00	53,00	62,00
25	2,00	12,00	16,00	23,00						50	19,50	46,00	49,50	54,00
80	1,25	11,00	23,00	27,00						1360	9,00	42,00	48,00	53,00
					30	1,75	17,00	18,00	23,00					
15	5,50	13,50	18,50	25,00										
					75	0,50	17,50	30,00	32,00	1020	9,00	49,00	52,00	55,00

örperchen in physiologischer Kochsalzlösung. Wirkung von Verdünnung.
der freien Plasmahöhen).

t (40 proz.) 45° unverdünnt	verdünnt[1]	22,5° unverdünnt	verdünnt[1]	♂ Hundeblut (40 proz.) 90° unverdünnt	verdünnt[1]	67,5° unverdünnt	verdünnt[1]	45° unverdünnt	verdünnt[1]	22,5° unverdünnt	verdünnt[1]
9,50	17,00	14,00	22,00	0	0,25	0,25	2,50	0,25	6,00	0,50	7,00
6,00	33,00	21,00	39,00	0	0,75	0,25	8,00	2,00	15,00	2,00	18,00
				0	1,00	0,75	11,50	3,00	22,00	3,00	26,00
4,00	58,00	35,00	65,00	0	1,25	1,00	15,50	4,00	28,00	5,00	33,00
9,00	65,00	41,00	74,00	0	1,50	1,50	19,00	4,50	32,00	7,00	38,00
3,00	70,00	45,00	80,00	0		2,00		5,00		8,00	
0,00	100,00	78,00	105,00								

Tabelle IX.

Wegfaktoren in unverdünnten und verdünnten Suspensionen (1 : 1 verdünnt)

$$\text{Faktor} = \frac{\text{Senkungshöhe in verdünnter Suspension}}{\text{Senkungshöhe in unverdünnter Suspension}}.$$

Zeit in Min.	Hefe, 40proz. Suspension in destillierten Wasser				♂ Kaninchenblut				♀ Kaninchenblut (in physiologischer NaCl gewaschen und suspendiert)				♂ Kaninchenblut (in physiologischer NaCl gewaschen und suspendiert)				♀ Hundeblut (in physiologischer NaCl gewaschen und suspendiert)				♂ Hundeblut			
	90°	67,5°	45°	22,5°	90°	67,5°	45°	22,5°	90°	67,5°	45°	22,5°	90°	67,5°	45°	22,5°	90°	67,5°	45°	22,5°	90°	67,5°	45	22,5°
15					2,0	1,6	1,8	1,6	1,3	2,8	2,6	9,5	3,0	5,5	4,6	5,1					∞	10,0	24,0	14,0
20	1,00	4,00		3,4													∞	20,0	6,1	3,6				
30					2,0	2,0	2,2	1,9	1,5	2,9	2,9	2,7	1,7	7,0	3,7	4,5	∞	7,0	5,4	5,3	∞	32,0	7,5	9,0
40	4,00	4,00	3,20	2,9																				
45									1,6	3,0	2,8	2,8					∞	6,6	4,7	4,9	∞	17,0	7,3	8,6
60					2,75	2,4	2,4	1,6	1,7	3,2	2,9	2,6	1,5	6,2	3,3	3,7					∞	15,5	7,0	6,6
65	5,0	3,8		2,4													∞	6,5	4,2	4,7				
75					2,4	2,3	2,2	1,8	1,7	3,0	2,5	2,1	2,5	4,1	2,8	3,0					∞	12,7	7,0	5,4
90					3,1	2,0	2,2	1,8					2,0	3,8	2,6	2,7	10,0	5,3	4,0	4,1				
105									1,8	2,9	2,3	1,9	2,25	3,6	2,8	2,6	10,0	5,1	3,8	3,6				
210	3,0	3,0	2,0	1,9																				
825	3,0	2,0	1,9	1,9	1,5	1,5	1,4	1,4																
1310	3,3	1,7	1,6	1,6									1,4	1,4	1,4	1,4								
2360	3,1	1,9	1,6	1,6																				

sind, und aus Tabelle IX, wo die aus den Senkungshöhen berechneten Faktoren (unverdünnt und 1 : 1 verdünnt) angeführt sind, hervorgeht.

Die verschiedenen Blutkörperchenarten unterscheiden sich viel wesentlicher untereinander als gegenüber Hefesuspensionen. Zugleich geht daraus auch hervor, daß bei Verdünnung die maximalen Unterschiede bei 90° nachweisbar sind und daß in den schiefen Röhren die Senkung viel gleichmäßiger als bei 90° abläuft. Sehr wesentlich ist es auch, daß, von einigen geringen Abweichungen abgesehen, die Senkung in den am meisten schief gestellten Röhrchen am wenigsten von der Verdünnung der Suspension beeinflußt wird.

Aus den im vorangehenden angeführten Versuchen geht also hervor, daß die Senkung der roten Blutkörperchen nicht auf *einen* physikalischen Faktor zurückzuführen sein wird, und es zeigt sich, daß zwischen der Senkung der Hefe und mancher Arten der roten Blutkörperchen größere Ähnlichkeiten bestehen als zwischen verschiedenen Blutkörperchenarten oder sogar zwischen verschiedenen Zuständen desselben Blutes.

Durch den Vergleich der Senkung der Hefe und der roten Blutkörperchen wird man auch eine bessere Einsicht in den Mechanismus der Senkung erhalten. Nur nach Klärung des quantitativen Ablaufes der verschiedenen Senkungstypen wird man für verschiedene Fälle die empfindlichsten Unterschiede angeben, wie auch die Konstanz der Resultate sichern können. Dies ist zugleich ein einfacher Weg, um die bei physiologischen wie pathologischen Fällen beobachteten Senkungsunterschiede näher erklären zu können, indem man sie auf einzelne Grundfaktoren zurückzuführen trachtet.

Über Farbe und Dispersitätsgrad. II[1]).

Von

L. Berczeller und H. Wastl.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Wien.)

(Eingegangen am 10. November 1923.)

1. Über die Farbenreaktionen der Stärke mit Halogenen.

Wo. Ostwald hat zuerst auf den Zusammenhang zwischen Farbe und Dispersitätsgrad hingewiesen, und diese Regel hat sich nicht nur bei den kolloiden Metallen, sondern auch bei einer Reihe von anderen anorganischen und organischen Kolloiden bewährt, wenn man sie auch nicht umkehren darf und sie nur bei bestimmter Reihenfolge der Farbenerscheinungen desselben Kolloids eine Gültigkeit besitzt.

Interessant sind in dieser Beziehung die Farbenreaktionen der Stärke bzw. Dextrine mit Jod. Es entspricht vollkommen der Regel, daß die größeren Stärketeilchen eine blaue, die kleineren Dextrinteilchen eine rote Färbung annehmen, wie dies von *Harrison*[2]) mit der Teilchengröße in Zusammenhang gebracht wurde.

Die Wirkung der Jodide auf die Farbe der Jodstärke läßt sich auch mit einer Peptisation erklären, wenn auch wahrscheinlich nicht im Sinne von *Harrison*. Dieser meinte, daß das Jod in der Jodstärke in kolloidaler Form vorhanden sei; nun wirken Jodide besonders in konzentrierter Lösung stark peptisierend auf Stärke[3]), und es wäre viel einfacher anzunehmen, daß die Rotfärbung eher auf eine Veränderung der Stärke als des Jodes zurückzuführen wäre.

---

[1]) I. Mitteilung: *L. Berczeller*, diese Zeitschr. 84, 160. 1917.

[2]) Kolloid-Zeitschr. 45, 10.

[3]) *Berczeller*, diese Zeitschr. 84, 106. 1917.

In dieser Hinsicht sind die Reaktionen der Stärke mit Mischungen der Halogene von besonderem Interesse. Wenn man die mit wässerigen Jodlösungen blaugefärbten Stärkelösungen mit wässerigen Brom- oder Chlorlösungen versetzt, so kann man beobachten, daß die Farbe der Lösungen dieselben Veränderungen aufweist — genau in denselben Farbennuancen — wie bei der Hydrolyse der Stärke. Es tritt eine violette, rotviolette, rote und endlich eine gelbe Farbe auf, wenn man allmählich die Menge des Broms bzw. Chlors in der Lösung vermehrt.

Besonders interessant ist es, wenn wir von einer KJ-haltigen Jodlösung ausgehen. Dabei wird zunächst, bis durch das Brom bzw. Chlor aus der Lösung Jod freigemacht wird, die blaue Farbe der Lösung sehr bedeutend vertieft, und erst bei größeren Zusätzen des zweiten Halogens schlägt die Farbe in Violett bzw. Rot um.

Damit ist ein weiterer Beweis dafür erbracht, daß zur Blaufärbung der Stärke keine Jodionen notwendig sind, wie dies von *Mylius*[1]) behauptet wurde.

Die rein rote Färbung der Stärke tritt bei äquivalenten Mengen von Jod und des anderen Halogens auf, und die Verdoppelung der Menge des Broms bzw. Chlors verursacht ein vollkommenes Verschwinden der Stärkefärbung, welche durch wiederholten Jodzusatz reversibel ist. Dieselben Farbenänderungen sind nicht nur an Stärkelösungen, sondern in ganz ähnlicher Weise auch bei in Wasser suspendierten Stärketeilchen zu beobachten.

Merkwürdig ist die Farbenveränderung der Jodstärke deswegen, weil in dem Falle der Halogenteil diese Veränderung der Farbe hervorruft und zwischen der Konzentration des Jods und der anderen Halogene ein chemischer Zusammenhang besteht, indem die Mischung des Jods mit äquivalenten Mengen der anderen Halogene die Rotfärbung verursacht. Allerdings kann dieser Punkt wegen des allmählichen Überganges der Farben nicht genau bestimmt werden. Jedenfalls spielt die Adsorption des Jods durch Stärke bei diesem Vorgang auch mit, so daß die Farbenänderungen nicht allein von den Äquivalentmengen abhängen, denn wenn man eine eben entfärbte Lösung (Jodstärkelösung + entsprechende Menge an Brom- oder Chlorlösung) mit reiner Stärkelösung vermischt, so kann man wieder eine Färbung der Probe beobachten, und zwar tritt in diesen Fällen, wenn auch sehr schwach, eine Blaufärbung auf.

---

[1]) *Mylius*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **20**, 691.

2. Über einige Adsorptionsverbindungen des Kupferhydroxyds.

Aus den chemischen Untersuchungen von *van Bemmelen* wissen wir, daß $Cu(OH)_2$ — wie andere Schwermetallhydroxyde — mit verschiedenen Mengen von Wasser Adsorptionsverbindungen bildet, wir wissen auch, daß die Bildung des CuO damit einhergeht, daß das CuO weniger Wasser adsorbiert.

Einer von uns konnte an anderer Stelle[1]) darauf hinweisen, daß das CuO auch gegenüber anderen Substanzen eine ganz andere Adsorptionswirkung ausübt als das $Cu(OH)_2$. Hier soll untersucht werden, welche Wirkung die adsorbierten Substanzen auf die Umwandlung des $Cu(OH)_2$ in CuO ausüben. In der Beziehung soll nur auf eine ältere chemische Beobachtung hingewiesen werden, wonach aus $CuCl_2$ gefälltes Hydroxyd sich mit der Zeit gar nicht schwarz färbt, so daß anzunehmen wäre, daß sich in Gegenwart von Cl'-Ionen kein Oxyd bildet.

Zunächst haben wir untersucht, wie die Umwandlung des $Cu(OH)_2$, welches aus verschiedenen Cu-Salzlösungen gefällt wurde, in CuO stattfindet.

Es konnte gezeigt werden, daß in SO_4''- und ClO_3''-haltigen Lösungen diese Umwandlung viel schneller stattfindet als in Cl'- und CH_3COO'-haltigen Lösungen. Am schnellsten findet die Umwandlung in ClO_3''-haltigen Lösungen, am langsamsten in Cl'-haltigen Lösungen statt. Die Differenz der Umwandlungsgeschwindigkeit bei Gegenwart von ClO_3'' bzw. SO_4'' ist gering, gegenüber Cl' und CH_3COO' aber sehr groß. Unsere Versuche bewiesen auch, daß auch in Cl'-haltigen Lösungen die Umwandlung in CuO stattfindet, nur ist die Bildung des CuO in ihnen viel langsamer als mit den anderen Anionen.

Diese Versuche lassen sich mit der schon an anderer Stelle erörterten Anschauung vereinigen, daß die Umwandlung des $Cu(OH)_2$ in CuO mit einer Vergrößerung der Teilchengröße einhergeht und die Differenz der Wirkungen der Ionen darauf beruht, daß die zweiwertigen Ionen eine stärkere Fällungswirkung auf das $Cu(OH)_2$ ausüben als die einwertigen Ionen. Diese Umwandlung des $Cu(OH)_2$ hat insofern ein kolloidchemisches Interesse, weil man in dem Falle die Veränderung der Teilchengröße an der Hand der Farbenänderung direkt beobachten kann, und zwar nicht an einem gelösten Kolloid, wie dies seit den Untersuchungen von *Zsigmondy* sehr oft studiert wurde, sondern in

[1]) *L. Berczeller*, diese Zeitschr. **98**, 230, 1919.

einem Gel, wo unsere Kenntnisse über die Veränderung der Teilchengröße noch recht spärliche sind.

Daß diese Umwandlung tatsächlich mit einer Vergrößerung der Teilchen einhergeht, läßt sich aus der Wirkung von *Schutzkolloiden* auf den Vorgang weiter beweisen. Die meistens gebrauchten Schutzkolloide können in dem Falle nicht benutzt werden, weil sie „Verbindungen" mit dem $Cu(OH)_2$ eingehen. Allerdings muß auch an der Stelle betont werden, daß es sich weder bei der Biuretreaktion, noch in den „Verbindungen" mit Stärke um wirkliche, stöchiometrische Verbindungen handelt, sondern auch in dem Falle bilden sich nur Adsorptionsverbindungen (derselbe Zusammenhang zwischen Farbe und Teilchengröße ist auch bei der Biuretreaktion zu beobachten), und es ist sehr schwer, eine scharfe Grenze zu ziehen zwischen den Schutzkolloidhüllen um die kolloiden Metallteilchen und zwischen den Adsorptionsverbindungen von $Cu(OH)_2$ mit Eiweiß oder Stärke. Zusatz von Eiweiß- oder Stärkelösungen auch unter solchen Bedingungen, unter denen keine Lösung des $Cu(OH)_2$ stattfindet, verursacht, daß $Cu(OH)_2$ sich nicht schwärzt. Man kann aber mit Hilfe der *wasserlöslichen Celluloseäthyläther* direkt den Beweis erbringen, daß diese als „Schutzkolloide" die Fällung des $Cu(OH)_2$ zu CuO verhindern. In den wässerigen Lösungen der Celluloseäther löst sich $Cu(OH)_2$ unter keinen Bedingungen, dennoch verhindern die Celluloseäther schon in sehr kleinen Konzentrationen die Schwarzfärbung des $Cu(OH)_2$.

Diese Tatsache ist auch für die Komplexbildung der $Cu(OH)_2$ mit mehrwertigen Alkoholen von Interesse, indem dies wieder darauf hinweist, daß dazu das Vorhandensein von freien Alkoholhydroxylgruppen notwendig ist. In den Celluloseäthern sind die freien Hydroxylgruppen in Ätherbindung vorhanden, sie können also kein $Cu(OH)_2$ lösen; in Stärkelösungen, besonders in löslicher Stärke, sind dagegen freie, $Cu(OH)_2$-lösende Hydroxylgruppen vorhanden.

Die Untersuchungen von *Wo. Ostwald*[1]) und *M. H. Fischer*[2]) haben direkt bewiesen, daß zwischen den verschiedenen Cuproverbindungen, wie Cuprooxyd und Cuprohydroxyd, Teilchengrößenunterschiede vorhanden sind, und zwar enthielten die gelben Niederschläge des $Cu(OH)_2$ kleinere Teilchen als die roten des Cu_2O. Unsere Versuche beweisen uns in mehrfacher Weise, daß zwischen CuO und $Cu(OH)_2$ dieselben

---

[1]) Kolloidchem. Beihefte 1911, S. 409.

[2]) The Journ. of Lab. and Clinic. Med. 3, 1—10, 1918; Science 45, 505—507, 1917.

Unterschiede bestehen, und zwar sind die schwarzen CuO-Teile so groß, daß sie nicht in kolloider Lösung zu erhalten sind. Die zweiwertigen, basischen Verbindungen des Kupfers enthalten größere Teilchen als die einwertigen. Die Veränderung der Farbe der Lösungen unter der Einwirkung lösender und fällender Mittel gibt uns demnach eine gute Nachweismethode für die Teilchengrößenveränderungen, und sie scheint auch geeignet zu sein für eine nähere Untersuchung der verschiedenen physiologisch-chemischen Farbenreaktionen, wo wir besonders oft, wie dies einer von uns[1]) an anderer Stelle zeigen konnte, die *Wo. Ostwald*sche Regel des Zusammenhanges zwischen Teilchengröße und Farbe anwenden können.

---

[1]) *Berczeller*, diese Zeitschr. 89, 160.

Über die Bestimmung des inkoagulablen Stickstoffs (Reststickstoffs).

Von

Fernando Fonseca (Lissabon).

(Aus der biochemischen Abteilung des städtischen Krankenhauses am Urban zu Berlin.)

(Eingegangen am 12. November 1923.)

Die Bestimmung des nicht koagulablen Stickstoffs, des Reststickstoffs, wie er der Kürze wegen in Deutschland allgemein genannt wird, stellt eine für experimentelle, sowie für klinische Zwecke außerordentlich wichtige Methode dar. Zu seiner Bestimmung bestehen eine ganze Reihe von Vorschriften, die zum großen Teil sehr zweckmäßig sind und bei richtigem Arbeiten durchaus *in sich vergleichbare* Resultate garantieren. Andererseits besteht schon seit längerer Zeit kein Zweifel darüber, daß die Resultate, welche die einzelnen Methoden geben, nicht miteinander vergleichbar sind. Es liegt auf der Hand, daß bei der Enteiweißung, die bei den verschiedenen Methoden bei verschiedener Reaktion, unter Anwendung verschiedener Mischungsverhältnisse usw. erfolgt, mehr oder weniger Substanzen an das Koagulum adsorbiert werden und so dem Nachweis entgehen. Es bestehen hierüber eine Reihe von Angaben: So hat z. B. *Amandus Hahn*[1]) kürzlich gezeigt, daß Kreatin bei allen Enteiweißungsverfahren, mit Ausnahme der Trichloressigsäuremethode, in solchem Maße festgehalten wird, daß eine Bestimmung nicht möglich ist. Diese Adsorptionserscheinungen werden sich natürlich in höherem Maße als bei kristalloiden bei kolloiden Körpern bemerkbar machen: Über dieses Verhalten wird in einer folgenden Arbeit aus dem hiesigen Institut von *Anciães* näheres mitgeteilt werden.

---

[1]) Zeitschr. f. Biol. 76, 247, 1922.

Mir kam es darauf an, zunächst einen Beitrag zu der rein praktischen Frage zu liefern, wie sich die Reststickstoffausbeuten bei den verschiedenen Enteiweißungsverfahren verhalten. Diese Frage ist schon gelegentlich geprüft worden, so von *Feigl*[1]), doch sind die Ergebnisse nicht genügend klar.

Ich verglich miteinander bei einer Reihe von Seris vier Methoden: die Enteiweißungsmethode mit kolloidalem Eisen, die Enteiweißung mit wolframsaurem Natrium und Schwefelsäure (beide Methoden in der Vorschrift der Mikromethodik von *Pincussen*), Enteiweißung mit Trichloressigsäure und endlich eine neue, von *Pincussen* angegebene, an anderer Stelle noch nicht veröffentlichte Methode. Die Enteiweißung mit Trichloressigsäure führte ich so aus, daß zu 2 ccm Serum 13 ccm destilliertes Wasser zugefügt wurden. Nach Mischung wurden 5 ccm 20proz. Trichloressigsäurelösung zugefügt, gemischt und filtriert. Vom Filtrat wurden 10 ccm weiter verarbeitet. Die neue Methode von *Pincussen* gestaltet sich folgendermaßen: 2 ccm Serum werden mit 16,4 ccm destillierten Wassers verdünnt und 0,8 ccm 20proz. Trichloressigsäure zugegeben. Nach Mischung werden 0,8 ccm einer 10proz. Natriumwolframatlösung zugefügt, gemischt, filtriert und 10 ccm zur Bestimmung genommen. Diese Methode, welche ebenso wie die anderen eine vollständige Enteiweißung garantiert, zeichnet sich rein technisch zunächst durch den verhältnismäßig geringen Reagenzienverbrauch aus. Darüber hinaus hat sie den großen Vorteil, daß sie auch vollständige Enteiweißung solcher Eiweißlösungen gestattet, die auf anderem Wege schwer oder gar nicht möglich ist. So gelingt es unter geringer Veränderung der Mengenverhältnisse, auch aus Gelatinelösungen das Eiweiß vollständig auszufällen.

Nach diesen vier Methoden prüfte ich, selbstverständlich unter Innehaltung aller Kautelen, genauer Kontrolle der Eiweißfreiheit der Filtrate, eine Anzahl von Seris, die mir aus dem Krankenhause zur Verfügung standen. Veraschung und Destillation erfolgte wie üblich, Titration mit n/50 Lösungen unter Anwendung von Methylrot als Indikator und Benutzung von Mikrobüretten. Leerbestimmungen wurden regelmäßig täglich ausgeführt. Nachfolgende Tabelle I gibt die in 1 ccm Serum erhaltenen Reststickstoffwerte. Die Patienten wurden teils nüchtern, gelegentlich auch nach dem Essen untersucht, ohne daß hier deutliche Differenzen hervortraten.

Es ergibt sich ein ganz eindeutiges Bild. In einzelnen Fällen zeigen die nach den verschiedenen Methoden gewonnenen Zahlen keinen Unterschied; meistens ist jedoch deutlich eine Differenz in dem Sinne festzustellen, daß die mit der Eisenenteiweißung gewonnenen Zahlen

[1]) Arch. f. exper. Path. u. Pharm. 83, 168ff.

Tabelle I.

Probe	Namen	Nüchtern oder gegessen	Krankheit	Methoden			
				Eisen	Wolfram	Trichloressigsäure	nach *Pincussen*
1	*Schultz* . .	nüchtern	Urämie	0,98	0,99	0,96	—
2	*Müller* . .	„	Schrumpfnieren?	verloren	0,406	0,406	—
3	Mischung .	—	—	„	0,315	0,364	—
4	*Müller* . .	nüchtern	Schrumpfnieren?	0,266	0,308	0,315	—
5	*Klose* . . .	gegessen	—	0,238	0,266	0,252	0,266
6	*Ziebell* . .	nüchtern	Nephritis	0,532	0,574	0,588	0,588
7	Mischung .	—	—	0,448	0,448	0,448	0,448
8	*Wacker* . .	gegessen	Apoplexie	0,28	0,336	0,364	0,364
9	*Plavit*. . .	„	Pleuritis	0,266	0,294	0,294	0,294
10	*Schwarting*	nüchtern	Prostathypertrophie ?	1,092	verloren	1,19	1,204
11	*Klose* . . .	„	nach Pneumonie	0,23	0,294	0,321	0,335
12	Mischung .	—	—	0,26	0,28	0,294	0,308
13	*Müller* . .	gegessen	Schrumpfnieren	0,28	0,294	0,315	0,322
14	Mischung .	—	—	0,315	0,350	0,357	0,364
15	*Walker* . .	nüchtern	normal	0,245	0,266	0,28	0,294
16	*Wandell* .	„	„	0,28	0,294	0,301	0,308
17	*Dobergotz* .	„	„	0,238	0,252	0,252	0,252
18	*Pessert* . .	gegessen	Nephritis	0,476	0,490	0,490	0,497
19	*Schönfeld* .	nüchtern	normal	0,259	0,308	0,308	0,308
20	*Blumental*.	„	„	0,21	0,224	0,238	0,238
21	*Kirchner* .	„	Rheumat.	0,252	0,238	0,308(?)	0,294
22	*Eggert*. . .	gegessen	Herzkrankheit	0,308	0,329	0,343	0,378

am niedrigsten sind: es kommen dann meistens die Werte der *Folin-Wu*schen Wolframsäuremethode. Die höchsten Werte geben die Verfahren mit Trichloressigsäure sowie die neue Methode nach *Pincussen*, wobei in den meisten Fällen letztere noch höhere Zahlen ergibt. Von den geprüften Verfahren muß also das letztere als dasjenige bezeichnet werden, mit dem es gelingt, den größten Teil des nicht koagulablen Stickstoffs nachzuweisen.

Eine zweite Frage, welche ich mir vorlegte, war die, ob die Nahrungsaufnahme einen deutlichen Einfluß auf den Reststickstoff ausübt. Die allgemeinen Vorschriften für die Bestimmung des Reststickstoffs gehen dahin, daß der Versuchsperson das Blut nüchtern entnommen werden soll, damit in das Blut gelangende zirkulierende Nahrungsabbauprodukte das Resultat nicht fälschen. Ich stellte meine Versuche so an, daß ich bei einer Reihe von Menschen den Reststickstoff einmal nüchtern, das andere Mal 3 Stunden nach einer bestimmten Nahrung prüfte; als solche wählte ich einmal Kohlenhydrat (200 g Brot + 25 g Mehl als Suppe), im zweiten Falle Eiweiß (drei Eier), im letzten Falle endlich Fett in Form von 125 g fettem Speck. Die Ergebnisse, die ebenfalls mit den vorher genannten vier Proben gewonnen wurden, zeigt Tabelle II.

Tabelle II.

Kohlehydratprobe. Name Schönfeld. 200 g Brot + 25 g Mehl (als Suppe).

	Eisen	Wolfram	Trichloressigsäure	Nach Pincussen
Nüchtern	0,259	0,308	0,308	0,308
3 Stunden nach Nahrungsaufnahme	0,28	0,28	0,308	0,308
Eierprobe. Name Blumental. 3 Eier.				
Nüchtern	0,21	0,224	0,238	0,238
3 Stunden nach Nahrungsaufnahme	0,21	0,266	0,266	0,266
Speckprobe. 1. Name Kirchner. 125 g Speck.				
Nüchtern	0,252	0,238	0,308 (?)	0,294
3 Stunden nach Nahrungsaufnahme	0,252	0,252	0,266	0,266
2. Name Springfeld. 125 g Speck.				
Nüchtern	0,252	0,308	0,315	0,336
3 Stunden nach Nahrungsaufnahme	0,252	0,310	0,308	0,322

Es ergibt sich daraus, daß der Einfluß von Kohlehydrat und Fett außerordentlich gering ist, wie auch nicht anders zu erwarten war. In einigen Fällen wurde sogar Abnahme beobachtet. Es dürfte daher nichts dagegen einzuwenden sein, wenn der Patient vor Reststickstoffbestimmung eine aus diesen Substanzen bestehende Nahrung zu sich nimmt. Anders liegen die Verhältnisse nach Eiweißnahrung: die Eisenmethode zeigt zwar keinen Ausschlag, die anderen drei dagegen eine deutliche Erhöhung. Da nach anderen Untersuchungen (*Anciães*) besonders die hochmolekularen Abbauprodukte, Peptone, vom Eisen-Eiweißniederschlag adsorbiert werden, dürfte die Vermehrung im wesentlichen auf diese Substanzen zurückzuführen sein.

Über die Rolle der Adsorption bei der Bestimmung des Reststickstoffs.

Von

J. H. Cascão de Anciães (Lissabon).

(Aus der biochemischen Abteilung des städtischen Krankenhauses am Urban zu Berlin.)

(Eingegangen am 12. November 1923.)

Es ist bekannt, daß die Ausbeuten, welche man bei der Bestimmung des inkoagulablen Stickstoffs, des Reststickstoffs in Eiweißlösungen, insbesondere im Blute erhält, je nach den verschiedenen angewandten Methoden voneinander differieren, wenn man auch sagen muß, daß bei Benutzung desselben Verfahrens die Werte, wenn auch nicht absolut richtig, so doch miteinander gut vergleichbar sind. In der voranstehenden Arbeit hat *Fonseca* mitteilen können, wie bei verschiedenen Enteiweißungsverfahren die erhaltenen Reststickstoffmengen voneinander differieren, und er hat zeigen können, daß die absolut höchsten Werte für den nicht koagulierbaren Stickstoff nach einer neuen, dort beschriebenen Methode von *Pincussen* gewonnen werden. Diese Schwierigkeiten, die sich schon bei einfachen Eiweißlösungen finden, wachsen, wenn in der Eiweißlösung noch ein zweiter Körper suspendiert ist, so wie wir es bei Anstellung der *Abderhalden*schen Reaktion, sei es bei Verwendung von Organstückchen, wie bei Anwendung von Organpulvern nach der Methode von *Pregl,* finden. Es schien von vornherein nicht zweifelhaft, daß diese verschiedenen Resultate durch Adsorptionserscheinungen bedingt sind: im ersten Falle ohne Organzusatz Adsorption an das entstehende Koagulum, im zweiten noch hinzukommend die Adsorption an das Organsubstrat. Während man unter Umständen den ersten Fehler durch eine entsprechende Versuchsanordnung ausschalten kann, ist die Adsorption an das Organ bisher nicht zu verhindern. Bei der *Abderhalden*schen Reaktion z. B. wird bei der üblichen Dialysiermethode nur die Organadsorption in Frage kommen: noch weiter sind *Falta* und *Richter* gegangen, indem sie für solche Zwecke die Ultrafiltration vorschlugen, die zwar bei Reststickstoffbestimmungen einen

Teil der Fehlerquellen ausschaltet, die aber andere große neue Schwierigkeiten schafft. Bisher ist die Ultrafiltration für quantitative Zwecke nur sehr bedingt zu verwerten, und es hängt durchaus von der Größe der Poren des Filters ab, was man in das Ultrafiltrat hereinbekommt. Da der Reststickstoff sich definitionsgemäß aus allen durch die gewöhnlichen Methoden nicht koagulierbaren stickstoffhaltigen Substanzen zusammensetzt, andererseits die Übergänge der höher molekularen Eiweißabkömmlinge gewissermaßen fließende sind, so wird es ganz von dem Filter abhängen, welchen Teil der unter dem Sammelnamen „Peptone" zusammengefaßten höheren Eiweißabkömmlinge man im Filtrat erhält. Wir finden also auch hier, wenn auch in anderer Art, dieselben Unstimmigkeiten wie bei den anderen Methoden.

Es war zu erwarten, daß Adsorption sich besonders bei den höheren Abbauprodukten des Eiweißes, den Peptonen, geltend machen würde, handelt es sich doch hier um hochmolekulare, kolloide oder zum mindesten an der Grenze von Kolloiden und Kristalloiden stehende Körper. Ich habe ganz systematisch nun versucht, die Adsorption für die verschiedenen im „Reststickstoff" vorhandenen Körper zahlenmäßig mit bestimmter Methodik zu prüfen. Die ersten Versuche beschäftigen sich damit, inwieweit eine Adsorption durch Organpulver stattfindet, teils durch Fibrin, teils durch ein nach der *Pregl*schen Vorschrift hergestelltes Organpräparat von Placenta, wie es für die *Abderhalden*sche Reaktion verwendet wird. Die Versuchsverhältnisse wählte ich so einfach wie möglich. Ich untersuchte Harnstoff, Kreatinin, Aminosäuren, Harnsäurelösung und endlich Pepton (*Witte*) auf ihre Adsorption in folgender Weise.

Für Harnstoff nahm ich 5 ccm einer 0,5 proz. Lösung, gab dazu Fibrin oder Plazenta, schüttelte gut um, gab dann 20 ccm destilliertes Wasser dazu, mischte gut, filtrierte und bestimmte nun den Stickstoff in 10 ccm Filtrat, andererseits den von 2 ccm der Harnstofflösung. Die Mikrokjeldahlbestimmung wurde nach den Angaben der Mikromethodik von *Pincussen* ausgeführt unter Benutzung von n/50 Lösungen und genauer Innehaltung aller Vorsichtsmaßregeln, insbesondere täglicher Ausführung von Leerbestimmungen. Ganz entsprechend sind die Versuche mit Kreatinin angestellt, wo eine 0,1 proz. Lösung angewandt wurde. Die Peptonversuche wurden angestellt mit einer 0,1 proz. Lösung von Wittepepton: alle anderen Versuche sinngemäß; alles Nähere findet sich in der Tabelle I, welche nebeneinander die Stickstoffmengen in der ursprünglichen Lösung und die in der gleichen Menge mit Organpulver behandelten Lösung zeigt. Weitere Untersuchungen im selben Sinne finden sich noch an späterer Stelle der Arbeit, wo zunächst die Adsorption an Organ, sodann die an Organ + Koagulum festgestellt wurde.

Tabelle I.

Versuche	Stickstoff gefunden	Stickstoff adsorbiert	Adsorption Proz.
Versuch 1.			
0,5 proz. Harnstofflösung	0,43	—	—
	0,43	—	—
	0,45	—	—
2 ccm 0,5 proz. Harnstofflösung + 0,5 g Fibrin	0,43	0,0	0,0
	0,43	0,0	0,0
	0,44	0,0	0,0
Versuch 2.			
2 ccm 0,1 proz. Kreatininlösung	0,71	—	—
	0,71	—	—
	0,70	—	—
2 ccm 0,1 proz. Kreatininlösung + 0,5 g Fibrin	0,67	0,04	5,6
	0,67	0,04	5,6
	0,66	0,05	7,0
Versuch 3.			
2 ccm 0,1 proz. Peptonlösung	0,31	—	—
	0,31	—	—
2 ccm 0,1 proz. Peptonlösung + 0,5 g Fibrin	0,23	0,08	25
	0,22	0,09	29
	0,22	0,09	29
Versuch 4.			
2 ccm 0,1 proz. Glykokollösung	0,42	—	—
	0,42	—	—
2 ccm 0,1 proz. Glykokollösung + 0,1 g Placenta	0,39	0,03	7
	0,39	0,03	7
Versuch 5.			
0,01 proz. Harnsäurelösung[1]	0,60	—	—
	0,60	—	—
0,01 proz. Harnsäurelösung + 0,2 g Placenta	0,55	0,05	8
	0,56	0,04	6,6
Versuch 6.			
2 ccm 0,1 proz. Peptonlösung	0,27	—	—
	0,27	—	—
2 ccm 0,1 proz. Peptonlösung + 0,2 g Placenta, 24 Stunden stehengelassen und nach diesen destilliertes Wasser zugegeben	0,17	0,10	37
	0,17	0,10	37

Die Resultate der Tabelle zeigen, daß die Adsorption der kristalloiden Substanzen eine verhältnismäßig geringe ist. Am geringsten war die des Harnstoffs, der vollständig wiedergewonnen werden konnte, eine Tatsache, die besonders darum von großer Wichtigkeit ist, weil dieser Körper die Hauptmenge des im Blute vorhandenen unkoagulierbaren Stickstoffs darstellt. Die Verluste für Kreatinin, Aminosäure und

[1]) 0,025 g Harnsäure, 10 ccm Lithiumcarbonatlösung 0,1 : 25 Wasser, 15 ccm Aqua dest.

Harnsäure liegen zwischen 5 und 8 Proz.: kleine Differenzen finden wir häufig, da es augenscheinlich nicht möglich ist, die Versuchsbedingungen ganz genau zu reproduzieren. Ganz anders sehen die Werte aus für Pepton. Hier ist die Adsorption 25 bis 30 Proz., was also durchaus dem entspricht, was zu erwarten war.

Es fragte sich nun, ob es vielleicht möglich wäre, diese Adsorption zu hindern bzw. einzuschränken. Ich führte dazu zunächst folgende Versuche aus, von der Ansicht ausgehend, daß vielleicht die Reaktion eine Rolle spielen könnte. Im ersten Versuch der Tabelle II habe ich ebenfalls 0,5 g Fibrin mit 4 ccm einer Peptonlösung versetzt und habe dazu je 16 ccm n/1000 H_2SO_4 bzw. $^1/_{1000}$ NaOH zugegeben. Es wurde wie üblich gut gemischt, filtriert und in 10 ccm der Stickstoff bestimmt. Es ergab sich keine Zunahme auf Säurezugabe, während bei Alkalizufügung die Adsorption sogar noch bedeutend größer war. Der zweite

Tabelle II.

Versuche	Stickstoff gefunden	Stickstoff adsorbiert	Adsorption Proz.
Versuch 1.			
2 ccm 0,1 proz. Peptonlösung	0,29 0,29	— —	— —
2 ccm 0,1 proz. Peptonlösung + 5 g Fibrin	0,238 0,238	0,05 0,05	17 17
2 ccm 0,1 proz. Peptonlösung + 0,5 g Fibrin + H_2SO_4 n/1000	0,238 0,238	0,05 0,05	17 17
2 ccm 0,1 proz. Peptonlösung + 0,5 g Fibrin + NaOH n/1000	0,21 0,21	0,08 0,08	27,5 27,5
Versuch 2.			
2 ccm 0,1 proz. Peptonlösung	0,28 0,28	— —	— —
2 ccm 0,1 proz. Peptonlösung + 0,5 g Fibrin	0,238 0,238	0,04 0,04	14 14
Zum Rückstand 10 ccm Mischung m/15 Phosphat p_H 6,24	Kein Reststickstoff herausbekommen		
Zum Rückstand 10 ccm Mischung m/15 Phosphat p_H 7,65	Kein Reststickstoff herausbekommen		
Versuch 3.			
2 ccm 0,1 proz. Peptonlösung	0,28 0,28	— —	— —
2 ccm 0,1 proz. Peptonlösung + 0,5 g Fibrin	0,22 0,22	0,06 0,06	21 21
2 ccm 0,1 proz. Peptonlösung + 0,5 g Fibrin + Mischung Phosphat p_H 6,24	0,22 0,238	0,06 0,04	21 14
2 ccm 0,1 proz. Peptonlösung + 0,5 g Fibrin + Mischung Phosphat p_H 7,65	0,22	0,06	21

Versuch dieser Tabelle sollte zeigen, ob es vielleicht gelingt, durch nachträgliche Zufügung einer etwas sauren bzw. etwas alkalischen Mischung adsorbierten Stickstoff herauszubekommen. Es wurden wieder 4 ccm Peptonlösung, 0,5 g Fibrin genommen, mit Wasser bis auf 20 ccm aufgefüllt, zentrifugiert und der Stickstoff bestimmt. Zum Rückstand wurden dann 10 ccm Phosphatlösung zugegeben, gut gemischt, abfiltriert und wiederum Stickstoff bestimmt: es gelang nicht, etwas der zu 14 Proz. adsorbierten Stickstoffmenge herauszubekommen. Im dritten Versuch der Tabelle endlich wurden die Verdünnungen sofort mit Phosphatmischungen verschiedener p_H ausgeführt: bei Verwendung einer sauren Lösung wurde in einem Falle eine größere Ausbeute erzielt.

Erheblich günstigere Erfolge konnten erzielt werden durch Zusatz von Kochsalzlösung, sei es sofort, sei es nachher. Tabelle III gibt über diese Versuche Auskunft.

Versuch 1 zeigt deutlich, daß bei Verdünnung mit Kochsalzlösung statt mit Wasser (0,5 g Fibrin + 4 ccm Peptonlösung + 16 ccm Wasser bzw. NaCl-Lösung) die Adsorption bedeutend geringer ist: statt 12 nur 4 Proz. Das gleiche zeigt noch deutlicher der nachfolgende Versuch, in welchem statt Fibrin Placenta angewandt wurde. Die Abhängigkeit von der Zeit des Kochsalzzusatzes zeigt Versuch 3 und 4. Es wurden 0,2 g Placenta mit 4 ccm Peptonlösung versetzt, 24 Stunden steril stehengelassen und darauf in das Röhrchen 16 ccm Kochsalz, bei Versuch 3 2 Proz., bei Versuch 4 5 Proz. gegeben. Die Adsorption war geringer, wenn die Kochsalzlösung stärker war. Der Versuch beweist, daß es gelingt, bereits adsorbiertes Pepton wieder loszulösen. Im Versuch 5 wurde ein anderes Pepton angewandt. Hier ergab sich, daß, während ohne Salzzusatz 21 bis 33 Proz. adsorbiert wurden, diese Menge bei sofortigem Zusatz einer 5proz. Kochsalzlösung auf 8,3 Proz. zurückging. Es fand überhaupt keine Adsorption mehr statt, wenn man die Placenta mit der Kochsalzlösung 24 Stunden stehen ließ und dann erst die Peptonlösung zufügte.

Diese Versuche zeigen mit Deutlichkeit, daß es gelingt, durch Zugabe von Kochsalzlösungen die Peptonadsorption an Organsubstrat bis auf einen sehr geringen Teil herabzudrücken.

Die zweite Frage war nun die, wie sich die verschiedenen Bestandteile des Reststickstoffs bei der Koagulation durch eiweißfällende Substanzen verhalten, inwieweit sie adsorbiert werden und ob auch hier die Adsorption durch andere Mittel zu beeinflussen ist. Aus Zweckmäßigkeitsgründen sind die hierher gehörenden Versuche im wesentlichen mit anderen vereinigt, in denen die Adsorption durch Organ + Koagulum geprüft wurde.

Tabelle III.

Versuche	Stickstoff gefunden	Stickstoff adsorbiert	Adsorption Proz.
Versuch 1.			
2 ccm 0,1 proz. Peptonlösung	0,25 0,25	— —	— —
2 ccm 0,1 proz. Peptonlösung + 0,5 g Fibrin	0,22 0,22	0,03 0,03	12 12
2 ccm 0,1 proz. Peptonlösung + 0,5 g Fibrin + NaCl 2 proz.	0,24 0,24	0,01 0,01	4 4
Versuch 2.			
2 ccm 0,1 proz. Peptonlösung	0,25 0,25	— —	— —
2 ccm 0,1 proz. Peptonlösung + 0,2 g Placenta	0,18 0,18	0,07 0,07	28 28
2 ccm 0,1 proz. Peptonlösung + 0,2 g Placenta + NaCl 2 proz.	0,25 0,24	0,0 0,01	0,0 4
Versuch 3.			
2 ccm 0,1 proz. Peptonlösung	0,25 0,25	— —	— —
2 ccm 0,1 proz. Peptonlösung + 0,2 g Placenta	0,196 0,196	0,05 0,05	20 20
2 ccm 0,1 proz. Peptonlösung + 0,2 g Placenta und nach 24 Stunden NaCl 2 proz.	0,22 0,22	0,03 0,03	12 12
Versuch 4.			
2 ccm 0,1 proz. Peptonlösung (*Witte*)	0,29 0,29	— —	— —
2 ccm 0,1 proz. Peptonlösung + 0,2 g Placenta	0,22 0,22	0,07 0,07	24 24
2 ccm 0,1 proz. Peptonlösung + 0,2 g Placenta, 24 Stunden stehengelassen und nach diesen NaCl 5 proz.	0,28 0,28	0,01 0,01	3,4 3,4
Versuch 5.			
2 ccm 0,1 proz. Peptonlösung sicc. e fibrin. sanguin. *Riedel*	0,24	—	—
Peptonlösung + 0,2 g Placenta	0,16 0,19	0,08 0,05	33 21
Peptonlösung + 0,2 g Placenta + NaCl 5 proz. (sofort)	0,22 0,22	0,02 0,02	8,3 8,3
0,2 g Placenta + NaCl 5 proz. 24 Stunden stehengelassen und nach diesen die Peptonlösung zugefügt	0,24 0,24	0,0 0,0	0,0 0,0

Die Anstellung der Versuche war die gleiche wie vorher. Es wurde die betreffende Lösung mit dem Organ versetzt, gut gemischt und darauf eine Fällung vorgenommen. In den Versuchen der Tabelle IV

Tabelle IV.

Versuche	Stickstoff gefunden	Stickstoff adsorbiert	Adsorption Proz.
Versuch 1.			
2 ccm 0,1 proz. Glykokollösung	0,38 0,39 0,39	— — —	— — —
2 ccm 0,1 proz. Glykokollösung und Enteiweißungsmethode mit Eisen (ohne Eiweiß)	0,35 0,35 0,35	0,04 0,04 0,04	10 10 10
2 ccm 0,1 proz. Glykokollösung und Enteiweißungsmethode mit Eisen und Fibrin (0,5 g)	0,35 0,33 0,32	0,04 0,06 0,07	10 15 18
Versuch 2.			
2 ccm 0,1 proz. Alaninlösung	0,34 0,34 0,34	— — —	— — —
2 ccm 0,1 proz. Alaninlösung + 0,5 g Fibrin	0,32 0,32	0,02 0,02	5,8 5,8
2 ccm 0,1 proz. Alaninlösung + 0,5 g Fibrin u. Enteiweißungsmethode mit Eisen	0,27 0,25	0,07 0,09	20 26
Versuch 3.			
2 ccm 0,1 proz. Peptonlösung	0,29 0,29	— —	— —
2 ccm 0.1 proz. Peptonlösung + 0,1 g Placenta	0,18 0,18	0,11 0,11	37 37
2 ccm 0,1 proz. Peptonlösung + 0,1 g Placenta, Enteiweißung mit Eisen (ohne Eiweiß)	0,04 0,04	0,25 0,25	86 86

wurde bei der Enteiweißung mit Eisen so vorgegangen, daß beispielsweise 4 ccm Glykokollösung in einen Meßkolben von 50 ccm eingefüllt wurden, die Lösung ungefähr auf 40 ccm aufgefüllt und nach gutem Durchmischen 5 ccm kolloidales Eisen zugefügt wurde. Nach leichtem Umschütteln fügte ich 1 ccm Magnesiumsulfat zu, wodurch die Koagulation ausgelöst wurde. Es wurde auf 50 ccm aufgefüllt, filtriert und die Hälfte des Filtrats in der üblichen Weise weiter behandelt. Für den Versuch: Glykokoll mit Fibrin wurde in das Kölbchen 0,5 g Fibrin, 4 ccm Glycinlösung hereingegeben und sonst ebenso verfahren wie bisher. Die Resultate zeigen die Stickstoffadsorption bei einfacher Anwendung der Glykokoll- usw. Lösung, sowie nach Zusatz von Fibrin. Aus den Versuchen der Tabelle IV ergibt sich, daß die Adsorption durch den Eiweißniederschlag erheblich größer ist als die durch das Organ: wir kommen bei Aminosäuren auf Werte von über 20 Proz. Verlust, bei Anwendung von Pepton sogar auf eine Adsorption von 86 Proz.: es geht also nur ein ganz verschwindender Anteil des angewandten Peptons in die freie Lösung über.

Das Bild ändert sich kaum, wenn man auch Eiweiß den Untersuchungslösungen hinzufügt. Die Adsorption ist auch hier besonders für Peptonlösungen eine sehr erhebliche. Im Versuch 1 der Tabelle V ist ein Versuch dargestellt, in dem eine Pepton-Eiweißlösung durch verschiedene Methoden enteiweißt worden war, und zwar wurden verglichen die Eisenmethode, die Wolframsäuremethode nach *Folin-Wu* und die neue, in der Arbeit von *Fonseca* ausführlich beschriebene Methode nach *Pincussen*. Die Adsorptionsquote war in allen Fällen hoch, wenn auch am niedrigsten bei der letztgenannten neuen Methode. Im Versuch 2 wurde ein gleicher Versuch unter Zusatz einer Kochsalzlösung (zu jeder Portion 2 ccm einer 20proz. Lösung) ausgeführt. Die adsorbierten

Tabelle V.

Versuche	Stickstoff gefunden	Stickstoff adsorbiert	Adsorption Proz.
Versuch 1.			
Peptonlösung[1])	0,095 0,095	— —	— —
Pepton-Eiereiweißlösung u. Enteiweißung mit Eisen	0,014 0,014	0,081 0,081	85 85
Pepton-Eiweißlösung u. Enteiweißung mit *Wolfram*	0,0 0,0	0,095 0,095	100 100
Pepton-Eiweißlösung u. Enteiweißung mit der *Pincussen*schen Methode	0,040 0,050	0,055 0,045	58 47
Versuch 2.			
Peptonlösung[1])	0,13 0,13	— —	— —
Pepton-Eiweiß-Kochsalzlösung[2]) u. Enteiweißung mit Eisen	0,04 0,04	0,09 0,09	69 69
Pepton-Eiweiß-Kochsalzlösung[2]) u. Enteiweißung mit *Wolfram*	0,04 0,04	0,09 0,09	69 69
Pepton-Eiweiß-Kochsalzlösung[2]) u. Enteiweißung mit der *Pincussen*schen Methode	0,056 0,056	0,07 0,07	54 54
Versuch 3.			
1 ccm Serum	0,196 0,196 0,196	— — —	— — —
2 ccm 0,1proz. Alaninlösung	0,34 0,34 0,34	— — —	— — —
1 ccm Serum + 2 ccm 0,1proz. Alaninlösung u. Enteiweißung mit *Wolfram*	0,49 0,49 0,50	0,05 0,05 0,04	9,3 9,3 7,4

[1]) 2 ccm 0,5proz. Peptonlösung, 8 ccm Wasser.
[2]) 14 ccm Eiereiweißlösung 1 : 10, 2 ccm 20proz. NaCl, 4 ccm 0,5proz. Peptonlösung.

Mengen sind auch hier hoch, jedoch etwas niedriger als ohne Kochsalzzusatz. Der Versuch 3 derselben Tabelle mit Alanin und Wolframenteiweißung zeigt, daß auch an das Eiweißkoagulum nur eine geringe Adsorption von kristalloiden Körpern stattfindet.

Die nun folgenden, in der Tabelle VI zusammengestellten Versuche sollten zeigen, ob es gelingt, aus den bei der Enteiweißung entstehenden Adsorptionsbindungen Stickstoff in Freiheit zu setzen und analysierbar zu gewinnen. Der Versuch 1 dieser Tabelle wurde so angestellt, daß zunächst Peptonlösung mit Eiereiweiß und Kochsalzlösung wie im Versuch 2 der Tabelle V vermischt wurde, mit den verschiedenen Methoden eine Enteiweißung vorgenommen und nun versucht wurde, aus dem Rückstand durch Kochsalzlösung oder Aceton einen weiteren Teil des Stickstoffs zu gewinnen. Die Ergebnisse über die Adsorption bestätigen die früheren Angaben, daß der weitaus größte Teil des Peptons an das Koagulum gebunden wird; bei der Methode von *Pincussen* ist wenigstens im Versuch 1 ebenso wie in den der vorigen Tabellen die Adsorption am geringsten. Der abzentrifugierte Niederschlag, der bei der Enteiweißung mit Eisen oder Wolframsäure entstand, wurde zunächst mit destilliertem Wasser ausgewaschen und darauf mit 20 ccm einer 5proz. Natriumchloridlösung gut verrührt. Nachdem wurde wieder zentrifugiert, der Rückstand soweit als möglich abgegossen und auf Stickstoffgehalt untersucht. Es ergab sich, daß eine gewisse Menge, nämlich 0,03 bzw. 0,06 Stickstoff auf diese Weise wiedergewonnen wurde. Der Rückstand, der bei der Enteiweißungsmethode von *Pincussen* erhalten wurde, wurde nach Abzentrifugieren und Auswaschen mit der gleichen Menge einer molaren Acetonlösung behandelt: hier ergab sich nur die geringe Menge von 0,014 mg Stickstoff. Der zweite Versuch wurde mit größeren Peptonmengen in ganz gleicher Weise angesetzt; das Koagulum, das bei allen drei Methoden erhalten wurde, wurde bei einer Versuchsserie ebenfalls mit Kochsalzlösung, bei der anderen mit einer molaren Acetonlösung behandelt, ein weiterer Versuch wurde mit einer m/3 Acetonlösung ausgeführt. Auch hier ergab sich durch die Auswaschung mit Kochsalzlösung eine nicht unerhebliche Zunahme des Stickstoffs, eine geringere Menge bei der Behandlung mit m/1 Acetonlösung, während mit m/3 Acetonlösung kein Stickstoff herausgelöst wurde.

Übersehen wir die hier geschilderten Versuche, so ergibt sich zunächst das erwartete Ergebnis, daß die Adsorption der hochmolekularen Abbauprodukte in allen Fällen, sei es an das Eiweißkoagulum, sei es an zugefügtes Organeiweiß, eine sehr beträchtliche ist, während die niedermolekularen, kristalloiden Abbauprodukte des Eiweißstoffwechsels sowie des Purinstoffwechsels nur in sehr geringer Menge zurückgehalten werden. Die praktische Folge hieraus ist, daß wir

Tabelle VI.

Versuche	Stickstoff gefunden	Stickstoff adsorbiert	Adsorption Proz.
Versuch 1.			
Peptonlösung[1])	0,135 0,135	— —	— —
Pepton-Eiweiß-Kochsalzlösung[2]) u. Enteiweißung mit Eisen	0,014 0,014	0,12 0,12	89 89
Pepton-Eiweiß-Kochsalzlösung[2]) u. Enteiweißung mit *Wolfram*	0,014 0,014	0,12 0,12	89 89
Pepton-Eiweiß-Kochsalzlösung[2]) u. Enteiweißung n. *Pincussen*	0,056 0,056	0,079 0,079	58 58
Zum Rückstand: NaCl 5proz.			
Niederschlag bei d. Enteiweißung mit Eisen + NaCl 5proz.	0,03	—	—
Niederschlag bei d. Enteiweißung mit *Wolfram* + NaCl 5proz.	0,06	—	—
Zum Rückstand: Aceton m/1.			
Niederschlag bei d. Enteiweißung nach *Pincussen* + Aceton m/1	0,014	—	—
Versuch 2.			
Peptonlösung[1])	0,28 0,28	— —	— —
Pepton-Eiweiß-Kochsalzlösung[2]) u. Enteiweißung mit Eisen	0,014 0,014	0,266 0,266	95 95
Pepton-Eiweiß-Kochsalzlösung[2]) u. Enteiweißung mit *Wolfram*	0,014	0,266	95
Pepton-Eiweiß-Kochsalzlösung[2]) Enteiweißung nach *Pincussen*	0,028 0,028	0,252 0,252	90 90
Zum Rückstand: NaCl 5proz.			
Niederschlag bei d. Enteiweißung mit Eisen	0,056	—	—
Niederschlag bei d. Enteiweißung mit Wolframsäure	0,056	—	—
Niederschlag bei d. Enteiweißung nach *Pincussen*	0,042	—	—
Zum Rückstand: Aceton m/1.			
Niederschlag bei d. Enteiweißung mit Eisen	0,014	—	—
Niederschlag bei d. Enteiweißung mit Wolframsäure	0,028	—	—
Niederschlag bei d. Enteiweißung nach *Pincussen*	0,014	—	—
Zum Rückstand: Aceton m/3.			
Niederschlag bei d. Enteiweißung mit Eisen	0,0	—	—

[1]) 2 ccm Peptonlösung 0,5 g-Proz., 1 ccm Kochsalzlösung 20 Proz., 7 ccm Aqua dest. — [2]) 14 ccm Eiweißlösung 1 : 10, 2 ccm NaCl-Lösung 20 Proz., 4 ccm Peptonlösung 0,5 Proz.

bei den Reststickstoffbestimmungen und ähnlichen Verfahren im wesentlichen nur die letzteren Körper nachweisen, während von den erstgenannten nur ein mehr oder weniger großer Bruchteil in den Filtraten erscheint. Wie sich aus dieser Arbeit in Übereinstimmung mit der vorangehenden von *Fonseca* ergibt, ist die Quote der adsorbierten Mengen für die verschiedenen Verfahren verschieden: auch bei ganz gleichmäßigem Arbeiten sind aber auch geringe Differenzen nicht zu vermeiden. Die Möglichkeit, durch Zusatz anderer Substanzen oder durch Auswaschen einen weiteren Teil des Stickstoffs der hochmolekularen Eiweißabbauprodukte zu erhalten, ist nur beschränkt: immerhin gelingt es, am besten durch Behandlung mit Kochsalzlösung, einen weiteren Teil der analytischen Bestimmung zuzuführen.

Studien zur Bestimmung der Abwehrfermente.

Von

Estenio Hormaeche (Montevideo).

(Aus der biochemischen Abteilung des städtischen Krankenhauses am Urban zu Berlin.)

(Eingegangen am 12. November 1923.)

Seit 1910, wo *Abderhalden*, *Freund* und *Pincussen* (1) zum erstenmal feststellten, daß dem Blutserum unter gewissen Umständen spezifische, eiweißspaltende Wirkungen zukommen, lag der Gedanke nahe, daß diese Tatsache, die zuerst für das Serum der Schwangeren festgestellt wurde, allgemeine Bedeutung hat, indem bei den verschiedensten Organveränderungen solche spezifischen Fermente im Blute vorhanden sein müßten. Nicht klar war es dabei, inwieweit diese spezifischen Fermente den unspezifischen verwandt seien, welche *Abderhalden* in Gemeinschaft mit *Pincussen*, *Weichardt* (2) und anderen nach Injektion artfremden Eiweißes festgestellt hat. Wir dürfen heute wohl annehmen, daß die Unspezifität dieser Fermente der Spezifität der z. B. bei der Schwangerschaft gefundenen insofern nahe steht, als es sich bei ersterer um eine Art Gruppenreaktion, wahrscheinlich in weitem Ausmaße, handeln muß, ähnlich den neuerdings auch therapeutisch angewandten weitgehenden Umstimmungen im Organismus bei der Proteinkörpertherapie. Aus dieser Anschauung erklären sich auch zwanglos die anscheinend ziemlich fließenden Übergänge zwischen spezifischer und unspezifischer Fermentwirkung bei der *Abderhalden*schen Reaktion, die vielfach zu falschen Schlüssen geführt hat. Es liegt in den meisten Fällen nicht so einfach wie bei der Gravidität, wo in dem sonst ganz normalen Organismus ein Organ bzw. Organkomplex zu erhöhtem Wachstum und Stoffwechsel angeregt wird. Bei den meisten Krankheiten finden wir ein so einfaches Verhalten nicht, fast stets sind mehrere Organe befallen, und wir können nicht erwarten, daß die Reaktion auf ein Organ so spezifisch ausfallen wird, wie wir das in den meisten Fällen bei der Prüfung auf Gravidität sehen. Hierzu kommt, daß, abgesehen von den Organen, denen nach unseren heutigen Anschauungen ganz spezifische Zellbausteine zukommen, wir noch andere Zellen im Organismus

haben, die bei allen Krankheiten mehr oder weniger in Mitleidenschaft gezogen sind, nämlich die weißen Blutkörperchen.

Während anfänglich von *Abderhalden* angenommen wurde, daß es sich bei der Reaktion um die Wirkung einer Art von Antikörpern handele, sind unsere heutigen Anschauungen durchaus andere. Nachdem durch die Untersuchungen von *Salkowski* und seiner Schüler, besonders *Jacoby*, gezeigt worden ist, daß aseptisch aufbewahrte Organe sich durch die in ihnen vorhandenen Fermente selbst verdauen, werden wir zu der Annahme gedrängt, daß solche autolytischen Vorgänge auch im Organismus stattfinden, daß die nicht mehr funktionsfähigen Zellen also in gleicher Weise dem Abbau anheimfallen. Die der betreffenden Zellart spezifischen Fermente gelangen so in die Blutbahn, und sie sind es, die wir mit der *Abderhalden*schen Reaktion nachweisen. Diese Anschauung wurde zuerst von *Pincussen* (3), sowie von *Jacoby* und seinem Schüler *Guggenheimer* (4) betont, und sie dürfte jetzt, nachdem auch *Abderhalden* sie angenommen hat, keinem Widerspruch mehr begegnen. Es ist klar, daß eine spezifische Reaktion also nur dann erkannt werden kann, wenn nur Fermente einer Zellart, ähnlich wie es im allgemeinen bei der Schwangerschaft ist, durch vergrößerten Untergang der betreffenden Zellen in die Blutbahn geschwemmt werden. Die Reaktion muß mehr oder weniger versagen, wenn verschiedene Zellarten in größerem Maße vernichtet werden, also verschiedene Zellfermente in das Blut gelangen. Ganz besonders kompliziert sich die Sache dann, wenn viele weiße Blutkörperchen zerstört werden, deren Ferment ganz unspezifisch ist. Das ist besonders von *Pincussen* (l. c. 3) wiederholt betont worden. Es ist klar, daß durch diese Verhältnisse die *Abderhalden*sche Reaktion nicht die Bedeutung gewinnen konnte, die man ihr zuerst zuschrieb. Wenn wir auch als wahrscheinlich annehmen müssen, daß die Grundlage der Reaktion durchaus richtig ist, so ist durch die mangelhafte Berücksichtigung dieser Verhältnisse, leider auch durch Unkritik bei Anstellung und Deutung der Reaktion viel Unheil geschaffen und die Konzeption von *Abderhalden* in Mißkredit gebracht worden. Es muß die Aufgabe weiterer Forschung sein, die der Reaktion jetzt anhaftenden Fehler zu beseitigen.

Es ist vorderhand nicht möglich, bei unseren heutigen Kenntnissen die oben genannten, aus der Pathologie sich ergebenden Schwierigkeiten zu eliminieren. Die Verwertung der Resultate kann nur in Gemeinschaft mit genauer Beobachtung am Krankenbette geschehen. Es liegt in weitem Felde, ob es uns einmal gelingen wird, z. B. die unspezifischen Fermente der weißen Blutkörperchen von den spezifischen der Organzellen abzutrennen. Aber auch die Methodik hat Anlaß zu außerordentlich vielen Fehlern geboten. Die besten Resultate scheint nach unseren bisherigen Erfahrungen immer noch die zuerst angewandte

optische Methode zu geben. Ihre weitere Anwendung verbietet sich ohne weiteres durch das Fehlen des kostspieligen Polarisationsapparates an den meisten Stellen, sowie die schwierige Darstellung der Peptone. Die meiste Anwendung hat bisher das Dialysierverfahren gefunden. Seine Fehler und Schwierigkeiten sind von verschiedenen Seiten genügend oft hervorgehoben worden, so daß es genügen mag, auf die verschiedene Durchlässigkeit der Hülsen und die immerhin nur schätzungsweise Anstellung der Ninhydrinreaktion hinzuweisen. Auch die Mikrobestimmung des Stickstoffs im Dialysat bessert nichts, da der Hülsenfehler unverändert fortbesteht. Die refraktometrische Bestimmung, die von *Pregl* und *de Crinis* (5) ausgearbeitet worden ist, hat zwar in Händen dieser Autoren gute Resultate ergeben, sie scheint mir jedoch nach Versuchen im hiesigen Laboratorium außerordentlich schwierig zu handhaben. Über die *Hirsch*sche (6) interferometrische Methode habe ich keine Erfahrung; sie soll gute Resultate geben, ist leider aber auch an einen sehr kostspieligen Apparat gebunden. Die beste und einfachste Bestimmung wäre die der Zunahme des inkoagulablen Stickstoffs nach Enteiweißung. *Abderhalden* sagt sehr richtig, daß wir eine gute Methode in dieser Beziehung noch nicht besitzen. Immerhin erschien es mir wichtig, systematisch in einer Anzahl von Fällen eine solche Methode anzuwenden: ich wählte dafür die von *Pincussen* (7) angegebene, die ich folgendermaßen ausführte.

Die erforderlichen Organeiweiße stellte ich nach der Methode von *Pregl* (l. c. 5) her. Möglichst blutfrei gewaschenes und von anderen akzidentellen Beimischungen gesäubertes Gewebe wurde nach oberflächlichem Abwaschen mit der Fleischmaschine zerkleinert, in einem hohen Standzylinder durch Zugabe einer reichlichen Menge Wasser ausgewaschen. Nach einiger Zeit setzt sich der Gewebsbrei ab, das Wasser wird abdekantiert, durch neues ersetzt, gut durchgerührt und nochmals gewaschen und so fortgefahren, bis die Hauptmenge des Blutes entfernt ist. Jetzt wird der Brei durch ein Tuch abkoliert und der Rückstand mit ungefähr der gleichen Menge Kochsalz gut verrieben. Die so erhaltene Masse wird nochmals durch die Fleischmaschine geschickt und das Auswaschen in der oben beschriebenen Weise so lange fortgesetzt, bis die überstehende Flüssigkeit ganz klar und farblos geworden ist, wodurch auch das Salz zum größten Teil entfernt ist. Die abkolierte Masse wird nun in die 100fache Menge siedenden, mit Essigsäure schwach angesäuerten Wassers eingebracht und unter gutem Rühren eine Viertelstunde lang koaguliert. Das Wasser wird abgegossen, durch neues ersetzt, wieder gekocht und diese Manipulation so oft wiederholt, bis das Kochwasser, das man bei den letzten Malen nur in ungefähr der vierfachen Menge des Gewebsbreies zusetzt, keine Ninhydrinreaktion mehr gibt. Man koliert ab, übergießt den Rückstand

in einer weithalsigen Flasche mit ungefähr der fünffachen Menge Alkohol, schüttelt 5 Minuten lang gut durch, gießt den Alkohol ab, ersetzt ihn durch die gleiche Menge einer Mischung gleicher Teile Alkohol und Äther, schüttelt wieder 5 Minuten, gießt den Alkohol-Äther ab und wiederholt das Verfahren mit reinem Äther. Nach Abfiltrieren des Organpräparats läßt man den noch in diesem befindlichen Äther verdunsten, kocht wiederum einigemal mit der fünf- bis zehnfachen Menge Wasser aus, indem man kontrolliert, daß die Ninhydrinreaktion negativ ist, und verfährt mit dem Rückstand genau wie das erstemal; das aus der letzten Ätherwaschung resultierende Präparat gibt nach Entfernung aller Ätherspuren ein mehr oder weniger gelblich gefärbtes Pulver. Wenn man Gehirn verarbeitet bzw. ein anderes Organ, das sehr viel Fettsubstanzen enthält, muß man vorher entfetten. Man trocknet dann den möglichst blutfrei gewaschenen Gewebsbrei möglichst schnell im *Faust*schen Apparat bei höchstens 35^0 und extrahiert die so erhaltene Masse bis zur möglichst völligen Entfernung des Fettes im *Soxhlet*schen Apparat. Das übrige Verfahren wird durchgeführt, wie eben geschildert.

Ich verfuhr nun folgendermaßen. In saubere Reagenzgläser aus Jenaer Glas brachte ich ein genau abgewogenes Quantum, 50 bzw. 30 mg des in der geschilderten Weise erhaltenen Präparates. Hierzu gab ich in den ersten Versuchen 4 ccm physiologische Kochsalzlösung und kochte kurz auf. Durch diese Behandlung wird einmal das Organpulver etwas gequollen und leichter angreifbar gemacht, andererseits auch vielleicht vorhandene Keime abgetötet. Später ersetzte ich dieses Verfahren durch ein anderes, welches eine noch stärkere Quellung, also Angriffsfähigkeit, gewährleistete. Ich gab genau 1 ccm n/10 HCl zu dem am Boden befindlichen Organpulver, ließ eine Stunde lang stehen, wodurch eine starke Aufquellung erfolgte, und neutralisierte nun die Säure durch die gleiche Menge n/10 NaOH; dann kam in beide Röhrchen 2 ccm physiologische Kochsalzlösung. In das eine Röhrchen fügte ich 2 ccm gut zentrifugierten frischen Serums, in das andere 2 ccm Serum, das eine halbe Stunde bei 60^0 inaktiviert worden war. Unter den üblichen Vorsichtsmaßregeln (vgl. *Abderhalden*) wurde mit reichlich Toluol überschichtet, zugestopft und 20 Stunden in den Brutschrank gesetzt. Nach dieser Zeit wurden die Röhrchen herausgenommen und der Inhalt unter wiederholtem Nachwaschen mit destilliertem Wasser durch ein angefeuchtetes Filter quantitativ in ein Meßkölbchen von 100 ccm überspült. Die Enteiweißung mit 8 ccm kolloidalem Eisen und 2 ccm Magnesiumsulfat, sowie die weitere Bestimmung erfolgte nach den Vorschriften der Mikromethodik von *Pincussen*. Es ist selbstverständlich, daß ich die Arbeit nicht begann, bevor ich an bekannten Objekten durchaus übereinstimmende Resultate

bekommen hatte. Es erwies sich als zweckmäßig, sehr feingeteilte Büretten (in $^1/_{50}$ ccm) zu verwenden und den Farbenumschlag mit Methylrot mit einer Farbprobe, die genau den Neutralitätspunkt zeigte, zu vergleichen. Die Ausführung von Kontrollen ist außerordentlich wichtig: ich machte an jedem Tage mehrere Leerbestimmungen, um den durch die Reagenzien bedingten Fehler auszuschalten. Besonders das Magnesiumsulfat muß genau kontrolliert werden: es ist nur in den reinsten Präparaten für unsere Zwecke brauchbar. Unter diesen Umständen war der maximale Fehler $^1/_{25}$ ccm n/50 Säure, entsprechend 0,01 mg Stickstoff: vielfach wurde aber auch dieser Fehler nicht erreicht.

In den nachfolgenden Tabellen ist einfach angegeben, wieviel inkoagulabler Stickstoff sich aus 1 ccm Blutserum bei aktivem und inaktivem Serum ergeben hat. Überwiegt der Stickstoff des aktiven den des inaktiven Serums, muß Stickstoff aus dem Organ durch aktives Serum abgebaut sein, die Reaktion also als positiv angesehen werden. Bei kleinen Unterschieden wird man freilich nicht entscheiden können, ob irgendwelche sekundäre Erscheinungen an dieser Differenz schuld waren. Es kommen zweifellos auch Adsorptionsvorgänge in Frage, so daß nicht der ganze Stickstoff aus abgebautem Eiweiß auf diese Weise nachgewiesen wird. Eine weitere Arbeit aus dem hiesigen Institut (*Anciães*) wird hierüber weiteren Aufschluß geben. Aus diesem Grunde sind die Differenzen in Wahrheit oftmals erheblich größer, als es nach den erhaltenen Zahlen anzunehmen ist. Tabelle I gibt die Resultate, die ich an 30 Fällen mit der oben skizzierten Methode gewonnen habe.

Wie man sieht, sind die Versuche durchaus nicht gleichmäßig. Vergleicht man die erhaltenen Ausschläge mit den nach der in wohl allen Fällen sicher festgestellten Diagnose, so finden wir bei einer Annahme von 0,01 mg N als Fehlergrenze in 66 Proz. ein übereinstimmendes, in 33 Proz. ein abweichendes Verhalten. Da es sich in allen diesen nicht stimmenden Fällen um negative *Abderhalden*sche Reaktion handelt im Gegensatz zu den meisten Autoren, die zu häufig positive Resultate erhielten, kommen die im pathologischen Verhalten des Organismus begründeten Fehler, über die ich oben ausführlich gesprochen habe, hier nicht in Betracht. Beim Carcinom ist natürlich möglich, daß das Substrat (es wurde Carcinom aus Lebermetastase sowie Präparat aus primärem Magencarcinom angewandt) nicht den Zellen bzw. Zellfermenten entsprach, die in dem betreffenden Organismus in größerer Menge zugrunde gingen. Ob man mit polyvalentem Carcinompräparat hier Besserungen schafft, wie es ja bereits versucht worden ist, will ich hier nicht diskutieren. Vielleicht kann man als Substrat fötales Gewebe anwenden, das in seiner Undifferenziertheit von manchen Pathologen dem Krebsgewebe an die Seite gestellt wird. Bei den

Tabelle I.

Nr.	Name	Krankheit	Angewandtes Organ	Unkoagulierb. N in 1 ccm Serum aktiv mg	inaktiv mg	Bemerkungen
1	*No.*	Lebercarcinom	Lebercarcinom	0,217	0,168	
			Gehirn	0,168	0,170	
2	*Se.*	Gesund	"	0,217	0,210	
3	*Me.*	Urämie	Nebenniere	0,378	0,372	
4	*Pa.*	Paralyse progr.	Gehirn	0,210	0,210	
5	*Ma.*	Urämie	"	0,210	0,210	
6	*We.*	Tabes	"	0,268	0,246	
7	*Ad.*	"	"	0,229	0,189	
8	*Sch.*	Uteruscarcinom	Lebercarcinom	0,294	0,210	
9	*Ke.*	Hypernephrom	"	0,272	0,196	Sektionsbefund: Hypernephrom mit Lebermetastasen
			Magencarcinom	0,246	0,240	
10	*Pau.*	Magencarcinom	Lebercarcinom	0,140	0,140	
			Magencarcinom	0,168	0,147	
11	*Wer.*	Rectumcarcinom	Lebercarcinom	0,238	0,182	
12	*Lo.*	Tabes	Gehirn	0,210	0,200	
13	*Sei.*	"	"	0,147	0,140	
14	*Schi.*	"	"	0,120	0,126	
15	*Dy.*	Magencarcinom	Magencarcinom	0,280	0,287	
16	*Ma.*	"	"	0,343	0,329	Sektion: Pyloruscarcinom
17	*Schm.*	Tabes	Gehirn	0,168	0,161	
18	*Ri.*	"	"	0,238	0,238	
19	*Schu.*	Magencarcinom	Magencarcinom	0,224	0,224	
			Lebercarcinom	0,224	0,210	
			Leber	0,182	0,182	
			Niere	0,189	0,189	
20	*Ko.*	Multiple Sklerose	Gehirn	0,220	0,201	
			Herz	0,209	0,176	
21	*Ku.*	Nephritis	Niere	0,334	0,312	
			Herz	0,309	0,302	
22	*Ju.*	Paralyse progr.	Gehirn	0,252	0,210	
23	*Sa.*	Magencarcinom	Lebercarcinom	0,240	0,224	
24	*Rie.*	"	Magencarcinom	0,287	0,271	
25	*Kr.*	"	"	0,440	0,422	
26	*Mei.*	Lebercarcinom	Lebercarcinom	0,319	0,315	
			Leber	0,312	0,294	
27	*Rie.*	Magencarcinom	Lebercarcinom	0,253	0,208	
28	*Po.*	Gravidität	Placenta	0,226	0,183	
29	*Mü.*	Eklampsie	"	0,238	0,179	
30	*Wo.*	Magencarcinom	Lebercarcinom	0,288	0,244	d. Operation bestätigt

Prüfungen mit Gehirn als Substrat, die vor allem bei Tabes und Paralyse ausgeführt wurden, scheint eine solche Annahme nicht nötig zu sein. Beide Krankheiten verlaufen so ungleichmäßig, mit Remissionen und Stillständen und plötzlichen Schüben, daß es mit der Theorie durchaus vereinbar erscheint, wenn unter Umständen bei solchen Kranken die *Abderhalden*sche Reaktion negativ ist. Nach dem vorher Gesagten ist sie ja nur in solchen Fällen positiv, wo größere Teile von Zellmaterial zerstört werden. Es ist müßig, hier gegen Autoren zu polemisieren,

die, wie z. B. *Fauser*, dauernd positive Reaktionen gefunden haben. Aus meinen Versuchen scheint hervorzugehen, daß ein positiver Ausfall der *Abderhalden*schen Reaktion, wenn man unspezifische Fermente ausschließen kann, hohe Beweiskraft besitzt, während ein negativer höchstens aussagt, daß ein akuter Prozeß zurzeit nicht vorhanden ist. Die oft erhobene Forderung, daß die Reaktion nur in enger Verbindung mit der Klinik bewertet werden darf, möchte auch ich mir zu eigen machen.

Es ist bekannt, daß die Fermentwirkung im allgemeinen an eine bestimmte Reaktion gebunden ist, und daß jedes Ferment charakterisiert ist durch eine bestimmte Reaktion, bei welcher seine Wirkung optimal ist. Es dürfte einem Zweifel nicht unterliegen, daß auch die bei der *Abderhalden*schen Reaktion nachgewiesenen Zellfermente eine solche optimale Reaktion haben müssen. Ich versuchte daher, den Abbau bei verschiedener p_H zu prüfen. Ich stellte diese in verschiedener Weise her: in den ersten Versuchen gab ich statt Kochsalzlösung zum Organpulver 5 ccm einer m/15 Phosphatlösung der betreffenden Reaktion, kochte auch hier auf und fügte dann Serum usw. wie stets hinzu. In anderen Versuchen setzte ich erst Salzsäure bzw. Natronlauge, wie oben beschrieben, zu, gab dann 1 ccm m/3 Phosphatlösung, endlich Serum und das übrige wie gewöhnlich. Im allgemeinen begnügte ich mich mit drei verschiedenen Aciditäten, p_H 6,2, 7,0 und 7,8. Die Versuche, welche ich in Tabelle II zusammengestellt habe, geben eine Übersicht der Ergebnisse.

Auch hier entsprechen die Resultate nicht immer den nach der klinischen Diagnose erwarteten. Immerhin sind sie erheblich günstiger als die der Tabelle I, besonders wenn man als maßgeblich die größte Differenz bei irgend einer p_H betrachtet. Das von mir verarbeitete Material ist nicht groß genug, um eine Gesetzmäßigkeit klar heraustreten zu lassen. Es ist immerhin zu bemerken, daß z. B. beim Abbau von Gehirn durch das Serum von Paralytikern bei p_H 6,2 die größten, bei p_H 7,8 die niedrigsten Werte des inkoagulablen Stickstoffs gefunden werden. Ganz ebenso sind die Ergebnisse beim Abbau von Leber durch Paralytikerserum. Übrigens bestätigt diese Tatsache die schon von anderer Seite angenommenen Beziehungen zwischen Leber und Gehirn. Auch beim Arteriosklerotikerserum ergab sich ähnliches Verhalten. Auch sonst finden sich wiederholt sehr deutliche und typische Differenzen. Ich möchte hier noch den Fall 1 herausheben, der deutlichen Abbau zeigt: das Ergebnis spricht für die Auffassung, daß bei Epilepsie Hirnsubstanz in größerer Menge zugrunde gehen muß, und daß es sich nicht um lediglich eine „funktionelle“ Erkrankung handelt.

Das Material, das ich verarbeiten konnte, ist leider zu gering gewesen, um die Frage weiter zu fördern; es scheint mir, daß man sie,

Tabelle II.

Nr.	Name	Krankheit	Angewandtes Organ	p_H	Unkoagulierbarer N in 1 ccm Serum aktiv mg	Unkoagulierbarer N in 1 ccm Serum inaktiv mg
1	*Kr.* . . .	Epilepsie	Gehirn	6,2	0,294	0,154
			"	7,0	0,336	
			"	7,8	0,336	
2	*Bu.* . . .	Paralyse	"	6,2	0,266	0,168
			"	7,0	0,266	
			"	7,8	0,238	
3	*Sch.* . . .	Arteriosklerose	"	6,2	0,280	0,259
			"	7,0	0,252	
			"	7,8	0,252	
4	*La.* . . .	Paralyse ?	"	6,2	0,266	0,266
			"	7,0	0,266	
			"	7,8	0,238	
5	*Ge.*	Urämie	"	6,2	0,350	0,308
			"	7,0	0,350	
			"	7,8	0,364	
6	*Lau.* . . .	Paralyse	"	6,2	0,238	0,196
			"	7,0	0,238	
			"	7,8	0,210	
			Leber	6,2	0,308	0,168
			"	7,0	0,280	
			"	7,8	0,252	
7	*Da.* . . .	Urämie	Gehirn	6,2	0,756	0,728
			"	7,0	0,728	
			"	7,8	0,756	
8	*Ku.* . . .	Paralyse	"	6,2	0,266	0,210
			"	7,0	0,266	
			"	7,8	0,266	
9	*Th.* . . .	Tabes	"	6,2	0,350	0,336
			"	7,0	0,336	
			"	7,8	0,350	
10	*Ru.* . . .	Nephrosklerose	"	6,2	0,364	0,364
			"	7,0	0,378	
			"	7,8	0,378	
11	*Me.* . . .	Urämie ? Nephrosklerose	"	6,2	0,392	0,350
			"	7,0	0,392	
			"	7,8	0,392	
			Niere	6,2	0,336	0,336
			"	7,0	0,350	
			"	7,8	0,350	
12	*Wi.* . . .	Tabes	Gehirn	4,6	0,210	0,126
			"	5,4	0,196	
			"	7,0	0,196	
			"	7,8	0,196	

außer mit dem Blute bei Carcinom und Gehirnerkrankungen, in größerem Maßstabe mit Gravidenserum aufnehmen muß: hier sind klare und unkomplizierte Verhältnisse, so daß hieran sich wohl ent-

scheiden lassen wird, ob die verschiedenen Organfermente wirklich verschiedene Optima besitzen. Ob es sich aber in Wirklichkeit dann um verschiedene Fermente handelt, oder ob das Problem ganz anders liegt, läßt sich vorläufig nicht voraussehen. Auch bei verschiedenen Optimis wäre es wohl denkbar, daß es sich schließlich in allen Fällen um *ein* Ferment handelt, das nur durch die Umgebung gewissermaßen als spezifisches Ferment erscheint. Nach den neuen Untersuchungen von *Willstätter* (8), der gezeigt hat, daß Blutlipase und Magenlipase, die ein ganz verschiedenes Optimum aufweisen, das gleiche Ferment sind, nur in verschiedenem Medium, wäre es sehr wohl möglich, daß bei den Organfermenten ähnliche Verhältnisse obwalten. Für unseren praktischen Zweck wäre immerhin die Feststellung des Optimums zum Zwecke der Differenzierung, sei es verschiedener Fermente, sei es ihrer verschiedenen Erscheinungsformen, ein erheblicher Fortschritt.

Literatur.

1) *Abderhalden, Freund* und *Pincussen*, Prakt. Ergebn. d. Geburtshilfe II, 2, S. 367, 1910. — 2) *Abderhalden* und *Pincussen*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **61**, 200, 1909; *Abderhalden* und *Weichardt*, ebendaselbst **62**, 120, 1909. — 3) *Pincussen*, Deutsch. med. Wochenschr. 1914, Heft 9. — 4) *Guggenheimer*, Ergebn. d. inn. Med. **20**, 281, 1921; Deutsch. med. Wochenschr. 1914, Nr. 2. — 5) *Pregl* und *de Crinis*, Fermentforschung **2**, 58. — 6) *Hirsch*, Abderhaldens Handb. d. biochem. Arbeitsmeth. 8. — 7) *Pincussen*, diese Zeitschr. **132**, 242, 1922. — 8) *Willstätter, Waldschmidt-Leitz* und *Memmen*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **125**, 93, 132, 1923.

Über das Vorkommen von Inulase in der Takadiastase.

Von

Y. Takahashi.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für experimentelle Therapie und Biochemie in Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 9. November 1923.)

In Arbeiten des hiesigen Instituts ist neuerdings gezeigt worden, daß eine ganze Reihe von Fermenten, wie *Sulfatase*[1]), verschiedene *Phosphatasen*[2]) und *Lecithase*[3]) Komponenten der Takadiastase darstellen. Jüngst haben *C. Neuberg* und *O. Rosenthal*[4]) in dem genannten Fermentmaterial auch eine *Cellase* aufgefunden und bereits das Vorkommen von *Inulase* angekündigt.

Wohl ist Inulase bereits mehrfach als ein Enzym beobachtet worden, welches das natürlich vorkommende Polysaccharid Inulin zu Fruchtzucker aufspaltet; ich erinnere nur an die Anwesenheit der Inulase in den Inulin führenden höheren Pflanzen. Inulase scheint aber auch unter den Fermenten des Tierkörpers[5]) aufzutreten, zum mindesten hat sich gezeigt, daß man aus verschiedenen animalischen Organen sowie Exkreten[6]) Inulin zerlegende Agenzien isolieren kann. In niederen Pilzen und Bakterien ist Inulase ebenfalls nachgewiesen worden, z. B. im Aspergillus niger[7]) und im Pneumococcus[8]).

---

[1]) *C. Neuberg* und *K. Kurono*, diese Zeitschr. **140**, 295, 1923; *J. Noguchi*, ebendaselbst **144**, 138, 1924.

[2]) *S. Akamatsu*, ebendaselbst **142**, 184, 1923; *J. Noguchi*, ebendaselbst **143**, 190, 1923.

[3]) *Derselbe*, ebendaselbst **142**, 186, 1923.

[4]) *C. Neuberg* und *O. Rosenthal*, ebendaselbst **143**, 399, 1923.

[5]) *R. Kobert* und *H. Fischer*, Pflügers Arch. **99**, 116, 1903; *W. Löb* und *S. Higuchi*, diese Zeitschr. **22**, 326, 1909; *H. Bierry*, C. r. **150**, 116, 1910; *T. Tanaka*, diese Zeitschr. **37**, 253, 1911.

[6]) *R. Okey*, Chem. Centralbl. **1920**, III, 675.

[7]) Vgl. außer der älteren Literatur *A. Kiesel*, Chem. Centralbl. **1915**, I, 1009; *E. Bourquelot* und *M. Bridel*, ebendaselbst **1922**, I, 15.

[8]) *O. T. Avery* und *Glenn E. Cullen*, ebendaselbst **1921**, I, 633.

Soweit ich sehe, ist aber bisher kein *Ferment-Dauer-präparat* bekannt, das Inulase im festen Zustande enthält, ähnlich wie Amylase in den verschiedenen Diastasepräparaten zu finden ist.

Bemerkenswerterweise kommt nun *in der Takadiastase eine deutlich wirkende Inulase* vor.

Die Tätigkeit dieses in der Takadiastase vorhandenen Ferments kann man leicht daran wahrnehmen, daß unter seinem Einflusse eine Lösung von reinem, nicht reduzierendem Inulin bald die Fähigkeit erlangt, aus alkalischen Lösungen von Cuprisalzen Kupferoxydul abzuscheiden. Gleichzeitig ändert sich das ursprüngliche Drehungsvermögen der mit dem Ferment digerierten Inulinlösung.

Während eine Lösung von gereinigtem Inulin mit gewöhnlicher obergäriger Hefe nicht in Gärung gerät, vermochte ich für die nach Inulase-einwirkung entstandenen Flüssigkeiten kräftige Vergärbarkeit nachzuweisen. Das Umwandlungsprodukt des Inulins ist als *d-Fructose* anzusprechen. Durch die unter besonderen Vorsichtsmaßregeln (siehe S. 201) angestellte Phenylhydrazin-probe, die d-Glucosazon lieferte, wurde der fermentative Abbau des Inulins durch die Inulase der Takadiastase bestätigt.

Bei den im folgenden beschriebenen Versuchen ging ich von käuflichem Inulin von *Merck* aus. Dasselbe besaß ein deutliches Reduktionsvermögen, enthielt also niedere Kohlenhydrate. Zur Befreiung davon wurde es gemäß einer von *P. Karrer* und *L. Lang*[1]) angegebenen Vorschrift durch mehrfache Ausfällung aus wässeriger Lösung mittels Alkohol gereinigt.

Das so gewonnene einwandfreie Material diente zu den *Fermentversuchen.*

Nachstehende Beispiele führe ich als Belege an:

1. 10 g lufttrockenes Inulin wurden in 500 ccm Wasser gelöst und nach Zumischung von 2,5 g Takadiastase mit 5 ccm Toluol versetzt. Das Gemisch wurde dann im Brutschrank bei 37° aufbewahrt. Nach 15 Minuten wurde die erste Drehungsbestimmung an einer klar filtrierten Probe vorgenommen. Zugleich wurde die vorhandene Menge reduzierender Substanz nach der Methode von *Pavy-Kumagawa-Sutō* festgestellt. Dazu möchte ich erwähnen, daß die zu Anfang ermittelte Reduktionskraft auf reduzierende Substanzen zu beziehen ist, die spurenhaft in der Takadiastase vorkommen.

---

[1]) *P. Karrer* und *L. Lang*, Helv. Chim. Act. 4, 253, 1921.

Das Ergebnis des 14 Tage lang ausgedehnten Versuches geht aus folgender Tabelle hervor.

Zeit nach der Mischung	Polarisation*)	Zuckergehalt von 100 ccm Lösung	Spaltung in Proz.
15 Minuten	— 1,2°	0,0476 g	2,38
1 Tag	— 1,45°	0,1458 g	7,29
2 Tage	— 1,75°	0,1944 g	9,72
4 „	— 1,70°	0,2440 g	12,20
5 „	unverändert	unverändert	unverändert
6 „	„	„	„
14 „	„	„	„

*) Die Takadiastaselösung war an sich optisch aktiv.

Dieser Übersicht kann man entnehmen, daß die Spaltung vom vierten Tage ab zum Stillstand kommt.

Genau das gleiche Ergebnis erzielte ich mit meinem Fermentpräparat auch sonst und gebe als Beweis dafür einen weiteren Versuch an.

Hier wurde eine Lösung von 5,0 g Inulin in 500 ccm Wasser mit 5 g Takadiastase und 5 ccm Toluol im Brutschrank belassen.

Zeit nach der Mischung	Zuckergehalt von 100 ccm Lösung	Spaltung in Proz.
15 Minuten	0.0486 g	4,86
1 Tag	0,1215 g	12,15
2 Tage	0,1798 g	17,98
4 „	0,2432 g	24,32
5 „	0,2430 g	24,30
7 „	unverändert	unverändert
14 „	„	„

In der mit dem halben Quantum an Inulin und dem zweifachen an Takadiastase ausgeführten Versuchsreihe zeigt sich, daß die Spaltung gerade doppelt so weit fortschritt. Rund ein Viertel der verwendeten Inulinmenge war in Fruchtzucker umgewandelt worden.

Zur Anstellung der Gärqrüfung wurden Teile der fermentativ gespaltenen Inulinlösung durch vorsichtiges Erwärmen vom Toluol befreit. In der so vorbehandelten Flüssigkeit trat, wie erwähnt, mit gewöhnlicher Hefe schnell und glatt *Gärung* ein, während das ursprüngliche Inulin nicht angegriffen wurde.

Bei Vornahme der *Osazonprobe* mit essigsaurem Phenylhydrazin ist zu berücksichtigen, daß nach Erfahrungen von *M. Bergmann* und *A. Miekeley*[1]) sowie von *H. Pringsheim* und *A. Aronowsky*[2]) unter der

[1]) *A. Bergmann* und *A. Miekeley*, Ber. 54, 2156, 1921.
[2]) *H. Pringsheim* und *A. Aronowsky*, ebendaselbst 55, 1416, 1922.

Einwirkung der vorhandenen Essigsäure eine Aufspaltung des Inulins und somit die Entstehung osazonbildenden Zuckers erfolgen kann. Herr Prof. *Neuberg* hat mich nun darauf hingewiesen, daß es möglich ist, durch Zusatz von reichlich Natriumacetat, und zwar von mindestens 4 Mol. kristallisierten essigsauren Natriums auf 1 Mol. angewandter Essigsäure, die hydrolysierende Wirkung der Essigsäure so weit zurückzudrängen, daß in einer Inulinlösung von gleicher Konzentration, wie der zur fermentativen Zerlegung benutzten, bei einstündigem Erwärmen im Wasserbade keine Osazonabscheidung erfolgt; erst beim Stehen in der Kälte fielen unbedeutende Mengen Osazon aus. Unter gleichen Bedingungen lieferte hingegen die durch Inulase gespaltene Inulinlösung schon in der Hitze einen dicken Brei von Glucosazonkristallen. Hierzu ist noch zu bemerken, daß die Menge des Natriumacetats, das die hydrolysierende Wirkung der Essigsäure hemmt, so groß ist, daß das zugegebene Phenylhydrazin in der Kälte nicht mehr klar gelöst ist, vielmehr hat man eine durch freies Phenylhydrazin hervorgerufene, schwach milchige Trübung vor sich.

Die Takadiastase enthält also Enzyme, die in der Reihe der Polysaccharide Stärke, Cellulose sowie Inulin angreifen. Im Hinblick auf die interessanten Ergebnisse *A. v. Tschermaks*[1]), denen zufolge Inulin- und Lichenin-spaltung in gewissen Fällen parallel gehen, wird es sich verlohnen, in der Takadiastase auch nach Lichenase zu suchen.

---

[1]) *A. v. Tschermak*, diese Zeitschr. 45, 452, 1912.

Biochemische Zeitschrift

Unter Mitwirkung von

herausgegeben von

C. Neuberg-Berlin

Hundertvierundvierzigster Band

Drittes und viertes Heft

Ausgegeben am 20. Januar 1924



Berlin

Verlag von Julius Springer

1924

Die

Biochemische Zeitschrift

erscheint in zwanglosen Heften, die in kurzer Folge zur Ausgabe gelangen; je sechs Hefte bilden einen Band im Umfange von 36—40 Bogen.

In der Regel können Originalarbeiten nur Aufnahme finden, wenn sie nicht mehr als $1^1/_2$ Druckbogen umfassen. Sie werden mit dem Datum des Eingangs versehen und der Reihe nach veröffentlicht, sofern die Verfasser die Korrekturen rechtzeitig erledigen. — Mitteilungen polemischen Inhalts werden nur dann zugelassen, wenn sie eine tatsächliche Richtigstellung enthalten und höchstens zwei Druckseiten einnehmen.

Manuskriptsendungen sind an den Herausgeber,

Herrn Prof. Dr. C. Neuberg, Berlin-Dahlem, Hittorfstr. 18,

zu richten.

Die Verfasser erhalten bis 100 Sonderabdrucke ihrer Abhandlungen kostenfrei bis zu einem Umfang von $1^1/_2$ Druckbogen, von größeren Arbeiten nur bis 75. Doch bittet der Verlag, nur die zur tatsächlichen Verwendung benötigten Exemplare zu bestellen. Über die Freiexemplare hinaus bestellte Sonderdrucke werden berechnet. Die Herren Mitarbeiter werden jedoch in ihrem eigenen Interesse dringend gebeten, sich, wenn irgend möglich, mit der kostenfrei zur Verfügung gestellten Anzahl zu begnügen, und falls mehr Exemplare unbedingt erforderlich sind, deren Kosten vorher vom Verlage zu erfragen, um unliebsame Überraschungen zu vermeiden.

Verlagsbuchhandlung Julius Springer

Berlin W 9, Linkstraße 23/24.

---

144. Band. **Inhaltsverzeichnis.** Heft 3/4.

Seite

Asada, Kazuo. Der Fettstoffwechsel bei der Avitaminose. V. Mitteilung: Über die Verteilung der Fette und Lipoide in der Leber nach Phosphorvergiftung bei normalen, hungernden und avitaminösen Tieren 203

Lüers, Heinrich und Paul Lorinser. Über die Hitze- und Strahlungsinaktivierung der Malzamylase 212

Kollmann, Gustav. Zur Kritik des üblichen Verfahrens zur Ermittlung des Purinbasengehaltes von Nahrungsmitteln 219

Fischer, Anton. Über den Kohlehydratstoffwechsel von Ascaris megalocephala 224

Revoltella, Giovanni. Weiteres über die Herstellung des Ureasetrockenfermentes und über die Methodik der Harnstoffbestimmung in normalen und pathologischen Harnen 229

Fortsetzung des Inhaltsverzeichnisses siehe 3. Umschlagseite.

Der Fettstoffwechsel bei der Avitaminose.

V. Mitteilung.

Über die Verteilung der Fette und Lipoide in der Leber nach Phosphorvergiftung bei normalen, hungernden und avitaminösen Tieren.

Von

Kazuo Asada (Kioto, Japan).

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 6. November 1923.)

Mit 6 Abbildungen im Text.

In meiner Arbeit[1]) über den Fett- und Cholesteringehalt der Leber nach der Phosphorvergiftung bei normalen, hungernden und avitaminösen Ratten habe ich folgende Tatsachen gefunden:

Neutralfett.

Bei der Avitaminose sinkt der Neutralfettgehalt der Leber, um gegen Ende der Krankheit wieder etwas anzusteigen. Nach der Phosphorvergiftung vermehrt sich der Neutralfettgehalt der Leber bei dem avitaminösen Tiere.

Im Hungerzustande (viertägiges Hungern im Anschluß an eine normale Ernährung) sinkt der Neutralfettgehalt der Leber etwa auf den Wert, den er im mittleren Stadium der Avitaminose hat. Nach der Phosphorvergiftung vermindert sich beim Hungertiere der Neutralfettgehalt der Leber weiter.

Beim normal ernährten Tiere nimmt der Neutralfettgehalt der Leber nach der Phosphorvergiftung zu.

Alles das trifft sowohl bei der Berechnung auf die frische Substanz wie auch auf die Trockensubstanz der Leber zu.

Cholesterin.

Bei der Avitaminose nimmt der Cholesteringehalt der Leber bei der Berechnung auf die frische Substanz nur undeutlich, bei der Berechnung auf die Trockensubstanz aber deutlich ab. Nach der Phosphorvergiftung erfährt der Cholesteringehalt der Leber bei der Avitaminose aber eine Steigerung bei jeder Berechnung.

Im Hungerzustande ist der Cholesteringehalt der Leber vermehrt, nach der Phosphorvergiftung zeigt er beim Hungertiere eine Herabsetzung bei jeder Berechnung.

---

[1]) *Asada*, Der Fettstoffwechsel bei der Avitaminose. III. Mitteilung. Diese Zeitschr. **142**, 165, 1923.

Beim normal ernährten Tiere ändert sich der Cholesteringehalt der Leber nach der Phosphorvergiftung nicht deutlich, nur manchmal zeigt er eine leichte Steigerung.

In Untersuchungen über den Metabolismus der Lipoide und der Fette in den Leberzellen hungernder oder mit Phosphor vergifteter Tiere haben *Salvioli* und *Sacchetto*[1]) bei Hunden und Meerschweinchen gefunden, daß in der Leber hungernder Tiere die neutralen Fette und Fettsäuren, die früher vorhanden waren, langsam verschwinden, und daß an ihre Stelle Lipoidsubstanzen treten. In der Leber von Hunden aber, die nach längerem Hungern (12 bis 28 Tage), oder bei Hunden und Meerschweinchen, die ohne voraufgegangene Hungerperiode mit Phosphor vergiftet wurden, ist ohne Zweifel das Vorhandensein neutraler Fette in den Zellen, die sie früher nicht enthielten, und deren beträchtliche Zunahme in Zellen, wo sie sich schon befanden, von diesen Autoren festgestellt worden.

Beim einfachen Hunger handelt es sich also um eine lipoide Verfettung der Leber; nach der Phosphorvergiftung aber um eine Leberverfettung durch neutrale Fette, die jedoch, wie *Salvioli* und *Sacchetto* hinzufügen, bei hungernden phosphorvergifteten Tieren höchstens mit einem leichten Grade lipoider Verfettung verbunden ist.

Nach meinen Analysen nimmt im Hungerzustande der Neutralfettgehalt der Leber ab, aber das Cholesterin, also ein Lipoidfaktor, nimmt zu. Das stimmt mit den anatomischen Beobachtungen von *Salvioli* und *Sacchetto* überein. Nach der Phosphorvergiftung fand ich beim Hungertiere eine weitere Verminderung des Neutralfettgehaltes der Gesamtleber und eine Verminderung ihres Cholesteringehaltes im Vergleich zu nicht phosphorvergifteten Tieren. *Salvioli* und *Sacchetto* behaupten auf Grund ihrer anatomischen Untersuchung das Gegenteil.

Dieser Widerspruch kann dadurch erklärt werden, daß ich an hungernden Ratten, *Salvioli* und *Sacchetto* aber an hungernden Hunden arbeiteten. Die Hungerhunde lebten noch 3 bis 4 Tage nach der Phosphorvergiftung, meine Hungerratten ausnahmsweise 3 bis 6 Tage, aber gewöhnlich nur 24 bis 48 Stunden, wobei die meisten Tiere, besonders kleinere, innerhalb von 24 Stunden starben. Je länger meine Hungerratten nach der Phosphorvergiftung lebten, um so geringer war der Neutralfettgehalt, aber um so höher der Cholesteringehalt der Leber. Bei dieser Sachlage schien es mir geboten, meine chemischen Analysenbefunde durch die mikroskopische Untersuchung der Leber zu kontrollieren, indem ich dieselbe Leber zum Teil chemisch, zum anderen Teil mikroskopisch untersuchte. Bei dieser Untersuchung

[1]) Frankf. Zeitschr. f. Path. 28, 1922.

unterstützte mich mein Kollege, Herr Prof. Dr. *Inamoto*, dem ich hierfür zu Dank verpflichtet bin. Ich habe also von den Lebern meiner Tiere Schnitte für die mikroskopische Untersuchung gemacht und dieselben mit Sudan auf Neutralfett nach *Ciaccio* auf Lipoide und Cholesterin (Jodfärbung) gefärbt. Das allgemeine Ergebnis meiner anatomischen Untersuchungen war folgendes:

In der Leber meiner Hungerratten (Abb. 5) fand sich im Vergleich zu Normallebern sehr wenig Neutralfett diffus über die Leber zerstreut, Lipoide und Cholesterin in wechselnden, aber nicht wesentlich veränderten Mengen; jedenfalls waren die Lipoide reichlicher vorhanden als Neutralfett.

In der Leber meiner phosphorvergifteten Hungerratten (Abb. 6) war das Neutralfett in geringen Mengen an einzelnen Stellen etwas massiert nachweisbar, aber der feine Fettstaub über der ganzen Leber fehlte fast vollständig, Lipoide und speziell Cholesterin waren relativ reichlich vorhanden, wenn auch bei den verschiedenen Tieren in wechselnder Menge. Ein strenger Parallelismus zwischen dem Gehalt an Cholesterin und Gesamtlipoid bestand nicht.

Hinsichtlich des Neutralfettgehaltes geht also das Resultat meiner chemisch-analytischen Untersuchung mit demjenigen meiner mikroskopischen Prüfung konform. Hinsichtlich des Lipoid- und Cholesteringehaltes zeigte die chemische Analyse eine Verminderung, die mikroskopische Prüfung aber keine Veränderung, eher eine Vermehrung. Da die chemische Analyse zweifellos eine Cholesterinverminderung in der Leber phosphorvergifteter Hungerratten erkennen ließ, im anatomischen Bilde aber diese nicht zum Ausdruck kam, kann es sich wohl nur darum handeln, daß das Cholesterin bei herabgesetzter Gesamtmenge in der Leber in äußerst kleinen Einzelteilchen über das Organ verstreut ist. Und was für das Cholesterin gilt, wird wohl auch für die Lipoide im allgemeinen zutreffen, da ja auch sie bei meinen Hungertieren und meinen phosphorvergifteten Hungertieren in ungefähr gleicher Weise im anatomischen Bilde in Erscheinung traten. Man sieht also, wie schwer sich aus dem anatomischen Bilde Rückschlüsse auf die quantitativen Verhältnisse ziehen lassen. Überhaupt möchte ich aus meinen histologischen Untersuchungen noch keine sicheren Schlüsse ziehen, da der Fett- und Lipoidgehalt bei den meisten Tieren zweifellos zeitlichen erheblichen Schwankungen unterworfen ist, und auch die Jodreaktion keine zuverlässige Methode zum Cholesterinnachweis ist. Jedenfalls müßte eine große Zahl übereinstimmender Untersuchungen vorliegen, bevor man sichere Schlüsse ziehen kann.

Nach alledem ist es also sehr wohl möglich, daß Lipoide bei phosphorvergifteten Hungertieren, wie *Salvioli* und *Sacchetto* anzunehmen geneigt sind, in geringfügigem Grade in der Leber an Stellen auftreten,

wo sie sonst vielleicht vermißt wurden; aber bei diesem Prozeß kann es sich nur um allerfeinste Partikelchen handeln, die nie und nimmer speziell den Verlust der Leber an Cholesterin kompensieren, den das Organ des hungernden Tieres nach der Phosphorvergiftung erleidet.

Es bleibt noch übrig, die Differenz der Beobachtungen von *Salvioli* und *Sacchetto* von meinen hinsichtlich des Neutralfettgehaltes der Leber zu erörtern.

Für die Ratte bedeutet ein viertägiges Fasten, bei dem das Tier nur Leitungswasser erhält, einen sehr schweren Eingriff. Länger als 3 bis 6 Tage leben weiße Ratten, wie ich sie gebrauchte, ohne Nahrungszufuhr überhaupt kaum; nur sehr große Tiere konnte ich bis zu 10 Tagen leben sehen. Das war gerade eine sehr große Schwierigkeit bei meinen Versuchen, daß zahlreiche Tiere schon nach drei- bis viertägigem Hungern eingingen, noch ehe ich sie mit Phosphor vergiften konnte. Ein 12- bis 28tägiges Hungern aber erträgt ein Hund fast ohne Gefahr für sein Leben. So wird man annehmen müssen, daß die Fettvorräte des Körpers meiner Hungerratten sehr viel weitgehender erschöpft waren als die Fettvorräte der Hungerhunde von *Salvioli* und *Sacchetto*, und daß auch alle anderen Fettquellen bei meinen Ratten in entsprechender Weise weniger herangezogen werden konnten. Zudem wird ja auch bei der Phosphorvergiftung nach *Sekita*[1]) obendrein noch die Kohlehydrat- und Fettverbrennung etwas gesteigert. Da nun meine Hungerratten in das Stadium der Phosphorvergiftung nur minimale Fettmengen mitbrachten und obendrein noch Fett etwas verstärkt umgesetzt wurde, konnte sich ja auch der Fettgehalt der Leber kaum vermehren, sondern mußte sich eher vermindern, wie das aus meiner chemischen und mikroskopischen Untersuchung hervorgeht. Die Hungerhunde von *Salvioli* und *Sacchetto* hatten also offenbar nicht lange genug gehungert, ihr Körper besaß noch genügend Neutralfett, das bei der Phosphorvergiftung nach der Leber wandern konnte. So erklärt sich ungezwungen die Verschiedenheit unserer Versuchsergebnisse.

Das Resultat aller dieser Darlegungen ist folgendes: Bei dem Hungertiere nimmt der Neutralfettgehalt in der Leber ab, der Lipoidgehalt, insbesondere auch der Cholesteringehalt zu. Bei dem phosphorvergifteten Hungertiere nimmt der Neutralfettgehalt der Leber nach Maßgabe der im Körper noch vorhandenen Fettmengen und -quellen und des Bildungsvermögens des Körpers für Fett aus anderen Materialien zu; im Erschöpfungszustande aber bei Hunger nimmt der Neutralfettgehalt der Leber nach der Phosphorvergiftung ab. Der Gehalt der

---

[1]) *N. Sekita*, Experimentelle Studien über Phosphorvergiftung. Mitt. a. d. med. Fak. d. kaiserl. Univ. Tokio 28, Heft 2, 1922.

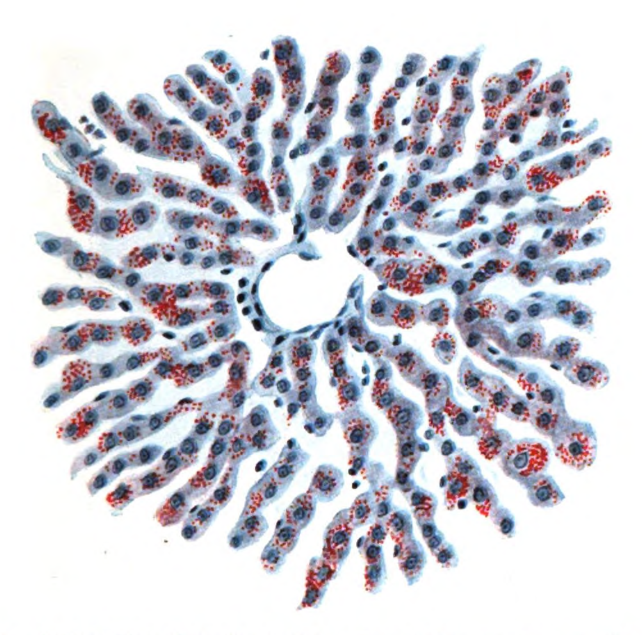


Abb. 1. Normale Rattenleber. Leitz. Occ. 1. Obj. 6. Formalinfixierung. Färbung mit Hämatoxylin und Sudan III. Die roten Körner stellen das Neutralfett dar. (Ratte Nr. 62.)

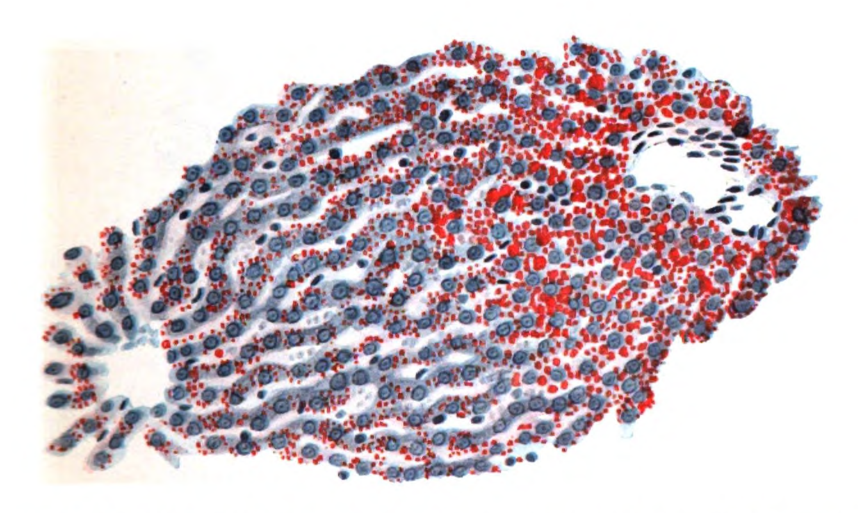


Abb. 2. Rattenleber nach Phosphorvergiftung. Leitz. Occ. 1. Obj. 6. Fixierung und Färbung wie oben. (Ratte Nr. 40.) Man sieht die enorme Fettzunahme.

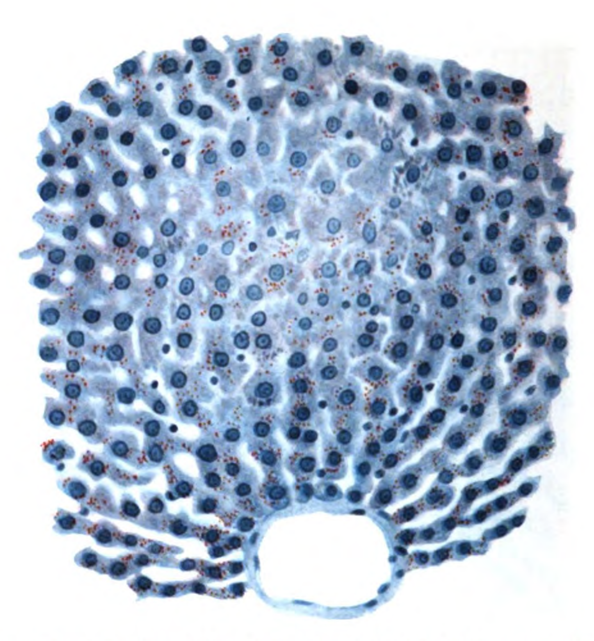


Abb. 3. Avitaminöse Rattenleber. Leitz. Occ. 1. Obj. 6. Fixierung und Färbung wie oben. (Ratte Nr. 59.) Man sieht verwachsene, nekrotische Teile in der Leber und wenig Fett.



Abb. 4. Avitaminöse Rattenleber nach Phosphorvergiftung. Leitz. Occ. 1. Obj. 6. Fixierung und Färbung wie oben. (Ratte Nr. 6.) Man sieht den großen Fettgehalt der Leber gegenüber der Leber auf Abb. 3.

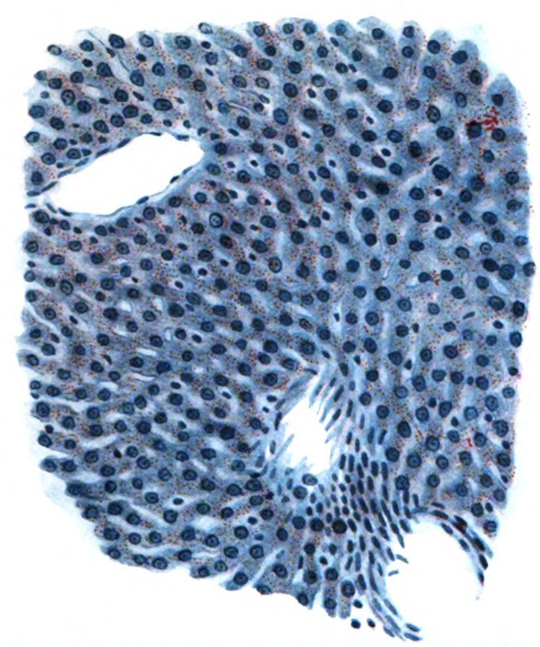


Abb. 5. Leber einer hungernden Ratte. Leitz. Occ. 1. Obj. 6. Fixierung und Färbung wie oben. (Ratte Nr. 29.) Die Leber zeigt über das ganze Organ verteilt feinste Fetttröpfchen.

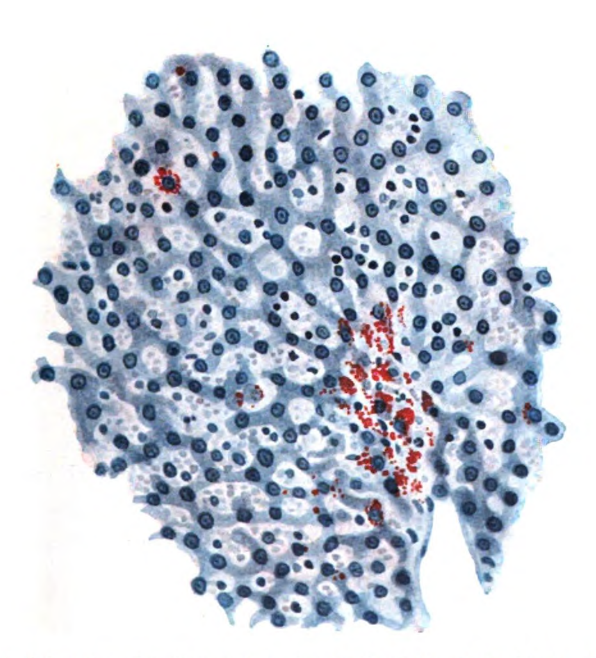


Abb. 6. Leber einer phosphorvergifteten hungernden Ratte. Leitz. Occ. 1. Obj. 6. Fixierung und Färbung wie oben. (Ratte Nr. 53.) Die Leber zeigt im Vergleich zu der Leber auf Abb. 5 nur eine sehr spärliche Fettvermehrung an einzelnen Stellen, hat aber ihre diffuse Fetteinlagerung verloren.

Leber an Lipoiden bleibt im ersteren Falle im wesentlichen unverändert, im letzteren Falle nimmt er, soweit das Cholesterin in Frage kommt, ab, aber weniger als der Neutralfettgehalt.

Ich habe nun weiterhin auch die chemisch analysierten Lebern meiner avitaminösen Ratten histologisch untersucht.

Bei den *avitaminösen* Tieren mit und ohne Phosphorvergiftung fand ich zunächst *Störungen am Protoplasma und Kern der Leberzellen.* Das Protoplasma war öfter aufgequollen, das Gerüst gelockert, auch Vakuolenbildung zeigte sich. Gelegentlich schienen ganze Leberbälkchen diffus degeneriert, detritusartig zerfallen, und dabei waren Ansätze zur Regeneration auch gelegentlich bemerkbar. Der Kern der Leberzellen war hier und da pyknotisch, hatte mitunter Stechapfelform; Anzeichen von Karyolyse waren vorhanden.

Im Gegensatz zu diesen Degenerationserscheinungen bei der Avitaminose waren bei den *Hungertieren* nur *rein atrophische* Erscheinungen am Protoplasma und Kern der Leberzellen nachweisbar. Das Chromatingerüst war bei den Hungerratten immer unverändert, bei den avitaminösen Tieren öfter gestört.

Das Neutralfett, die Lipoide und das Cholesterin ließen bei den nicht phosphorvergifteten avitaminösen Tieren im mikroskopischen Bilde keinen wesentlichen Unterschied erkennen im Vergleich zu den Normaltieren. Die phosphorvergifteten avitaminösen Tiere boten im mikroskopischen Bilde dasselbe Verhalten hinsichtlich der Neutralfett-, Lipoid- und Cholesterinverteilung in der Leber dar, wie die phosphorvergifteten Normaltiere. Immer war das Neutralfett bei der Phosphorvergiftung vermehrt. Dazu war bei den nicht phosphorvergifteten Normaltieren und avitaminösen Tieren durchschnittlich das Neutralfett mehr in der Peripherie der Läppchen und die Größe der Tropfen war ungleichmäßig, bei den phosphorvergifteten Normaltieren und avitaminösen Tieren aber war das Neutralfett mehr diffus über die Läppchen zerstreut und die einzelnen Fetttröpfchen waren gleichmäßiger groß als im ersten Falle.

Im anatomischen Bilde kommt also die Vermehrung des Neutralfettes in der Leber bei den Normaltieren (Abb. 1 und 2) und avitaminösen Tieren (Abb. 3 und 4) nach der Phosphorvergiftung, wie ich sie durch die chemische Untersuchung feststellte, deutlich zum Ausdruck.

Die Vermehrung des Lebercholesterins aber, die ich bei der chemischen Untersuchung nach der Phosphorvergiftung bei avitaminösen Tieren feststellte, konnte im mikroskopischen Bilde nicht erkannt werden. Das mikroskopische Bild zeigte auch keine wesentlichen Veränderungen im Gesamtlipoidgehalt der avitaminösen Leber im Vergleich zur Normalleber.

Das *Ergebnis* dieser Untersuchungen ist also folgendes: Abgesehen von den für die Avitaminose eigentümlichen Strukturveränderungen am Protoplasma und Kern der Leberzellen bietet die phosphorvergiftete avitaminöse Leber dasselbe mikroskopische Bild dar wie die phosphorvergiftete Leber eines nicht avitaminösen Tieres. Trotzdem ist der Cholesteringehalt der phosphorvergifteten avitaminösen Leber gesteigert, wie die chemische Analyse ergibt.

Protokolle.

Die Einzelheiten der Versuchsanordnung finden sich in meiner Arbeit: Der Fettstoffwechsel bei der Avitaminose. Der Fett- und Cholesteringehalt der Leber nach der Phosphorvergiftung bei normalen, hungernden und avitaminösen Ratten. (Diese Zeitschr. **142**, 165, 1923.)

Zwischen dem Todeseintritt und der Fixierung der Lebern in Formalin verstrichen bei den getöteten Tieren nur wenige Minuten; bei den spontan gestorbenen Phosphortieren aber höchstens 12 Stunden. Im letzteren Falle wurden die Tiere einen Teil dieser Zeit im Eisschrank aufbewahrt.

Die Nummern der Ratten auf den Abbildungen beziehen sich auf die Versuchsprotokolle in meiner dritten Mitteilung.

Von der detaillierten Darstellung aller anatomischen Befunde sehe ich hier ab, weil sonst die Arbeit zu umfangreich werden und sich nicht dem Rahmen dieser Zeitschrift einfügen würde. Ich will nur hier anfügen, daß meinen anatomischen Befunden die mikroskopische Untersuchung an 62 Ratten zugrunde liegt.

Über die Hitze- und Strahlungsinaktivierung der Malzamylase.

Von

Heinrich Lüers und Paul Lorinser.

(Aus dem Laboratorium für angewandte Chemie der Technischen Hochschule in München.)

(Eingegangen am 11. November 1923.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Vor kurzem haben die Verfasser in dieser Zeitschrift[1]) Versuche über die Hitzeinaktivierung der Amylase in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration bekanntgegeben. In der vorliegenden Veröffentlichung wird über die Fortsetzung und Erweiterung der Versuche berichtet. Sie erstreckten sich auf die Feststellung des Einflusses der Acetatpufferkonzentration, der Gegenwart fremder Substanzen, wie Gelatine, Eialbumin, Gummiarabikum und Maltose, und wurden schließlich noch auf die Inaktivierung der Amylase durch ultraviolette Strahlen ausgedehnt.

Bevor wir unsere Versuchsergebnisse mitteilen, müssen wir noch auf eine jüngst erschienene Veröffentlichung *Efr. Ernströms*[2]) in dieser Zeitschrift erwidern. *Ernström* hat vor unserer oben genannten ersten Veröffentlichung über dieses Thema eine umfangreiche Arbeit[3]) über das gleiche Gebiet gebracht, die uns zu unserem lebhaften Bedauern damals entgangen ist. Wir wurden erst später durch das Chemische Zentralblatt darauf aufmerksam und haben sie in der Dissertation des einen von uns [*Lorinser*[4])] dann selbstverständlich berücksichtigt. *Ernström* gelangte zunächst zum gleichen Ergebnis wie wir, insofern er ebenfalls das Maximum der Thermostabilität der Malzamylase etwa bei der Wasserstoffzahl ihrer optimalen Wirksamkeit fand. Ein Unterschied aber bestand darin, daß bei *Ernström* die Resistenz der Amylase im Gebiete von p_H 5,5 bis 6,5 bedeutend größer als bei uns war. Wir glauben den Grund hierfür in der Acetatpufferkonzentration und in der Gegenwart anderer Begleitstoffe des Enzyms annehmen zu dürfen.

---

[1]) Diese Zeitschr. **133**, 487, 1922.
[2]) Ebendaselbst **141**, 40, 1923.
[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **119**, 190, 1922.
[4]) Dissertation Technische Hochschule München 1923.

Einfluß der Acetatpufferkonzentration auf die Hitzeinaktivierung der Malzamylase.

Die in unserer ersten Mitteilung behandelte Versuchsserie war bei einer Acetatpufferkonzentration von der Normalität $^1/_{100}$ (bezogen auf das endgültige Reaktionsmedium) durchgeführt worden. Da wir in den späteren Versuchen mit Körpern, wie Gelatine, Albumin usw., zu arbeiten beabsichtigten, für welche das Puffersystem vielleicht zu schwach war, wiederholten wir die Versuchsreihe mit n/10 Acetatgemischen und neuer Amylase, bemerkten aber sogleich, daß sich die Inaktivierungskurve etwas nach der alkalischen Seite verschoben hatte. Wir führten diese Erscheinung zuerst auf eine Verschiedenheit der $(H^{\cdot})$ zurück, was sich jedoch als unhaltbar erwies, als wir die Wasserstoffzahlen elektrometrisch kontrollierten und diese innerhalb der Fehlergrenzen mit den berechneten übereinstimmten. Zur weiteren Klärung der Sachlage variierten wir nun die Acetatpufferkonzentration zwischen n/10 und n/100 unter Einschaltung von n/20, n/50 und n/75. Um alle Fehlerquellen zu vermeiden, gingen wir bei der Herstellung dieser Konzentrationen von einer Stammlösung normaler Essigsäure und normalen Na-Acetats aus. Das Ergebnis der Versuche (Protokolle Nr. 1 bis 10) ist graphisch in Abb. 1 veranschaulicht. Wenn man auch bei einem Vergleich der Inaktivierungskoeffizienten bei n/100 und n/75 Pufferkonzentration einerseits und n/10 und n/20 andererseits nur Unterschiede in der Fehlergrenze annehmen kann, so ist doch ein Gang der Werte nicht zu verkennen, der bei vergleichender Gegenüberstellung der Grenzwerte der Reihe, also bei n/100 und n/10 Pufferkonzentration eine augenscheinliche Differenz zutage treten läßt. Es erscheinen die beiden Kurven um den Betrag von 0,3 bis 0,4 Abszissenteilen gegeneinander verschoben. Worin die tieferen Gründe dieser Verschiebung zu suchen sind, läßt sich zurzeit nicht endgültig feststellen, möglicherweise sind sie in einer Wirkung der höheren Salzkonzentration auf den Zustand des Enzyms oder seiner Begleitstoffe begründet.

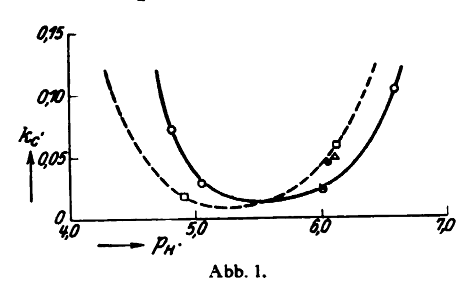


Abb. 1.
Einfluß der Konzentration des Acetatpuffergemisches.
□ n/100. △ n/75. ● n/50. × n/20. ○ n/10.
——— ohne Gelatine. – – – mit 1 Proz. Gelatine.

Schutzwirkung von Begleitstoffen auf die Hitzeinaktivierung der Malzamylase.

Zu den Versuchen wurde Gelatine, Eialbumin und Gummiarabikum verwendet. Die beiden Eiweißkörper waren vorher elektrolytfrei dialysiert worden. Die Konzentration der Amylase betrug 0,1 Proz.,

die der Gelatine 1 Proz., des Eialbumins und Gummiarabikums 2 Proz. Die Inaktivierungstemperatur war 55,5° C. Die Wasserstoffionenkonzentration wurde mit n/10 Acetatpuffergemischen festgelegt. Die Prüfung der Wirksamkeit der inaktivierten Amylaselösungen erfolgt bei der optimalen Wasserstoffionenkonzentration nach den in unserer ersten Mitteilung gegebenen Richtlinien. Die Inaktivierungskoeffizienten wurden aus den monomolekularen Reaktionskonstanten berechnet, wobei diesmal als k_0 die Reaktionskonstante der Nullprobe nach Erreichung der Inaktivierungstemperatur gewählt wurde. Für die graphische Darstellung wurden die Inaktivierungskoeffizienten für eine Inaktivierungszeit von jeweils 30 Minuten benutzt. Zur Vereinfachung sind in den Versuchsprotokollen Nr. 11 bis 24 nur die für 30 Minuten gültigen Werte aufgeführt, obgleich auch die für 15 und 60 Minuten gültigen ermittelt wurden. Nachdem alle drei Versuchsserien im wesentlichen das gleiche Ergebnis zeitigten, ist in Abb. 2 nur die Versuchsserie mit Gelatine dargestellt. Man erkennt daraus, wie sich die Inaktivierungskurve nach den niedrigen Wasserstoffionenkonzentrationen zu deutlich verflacht. Die Zone der maximalen Widerstandsfähigkeit erfährt eine Verbreiterung, die sich von p_H 5,2 bis 6,1 ziemlich gleichmäßig erstreckt. Ganz ähnliche Verhältnisse ergaben sich auch für Eieralbumin und Gummiarabikum. Auch hier war die hemmende Wirkung auf der Seite der höheren p_H-Werte deutlich ausgeprägt, im sauren Gebiete dagegen unbedeutend. Veränderungen der Wasserstoffionenkonzentration kamen nicht in Betracht, da diese elektrometrisch nachkontrolliert worden war und nur unbedeutend von der berechneten abwich.

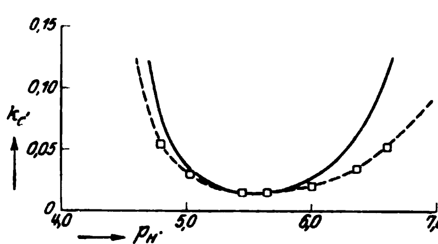


Abb. 2. Schutzwirkung von Gelatine auf die Hitzeinaktivierung der Malzamylase.

Im Zusammenhang mit diesen Feststellungen ist die Beobachtung von *Hudson* und *Paine*[1]) über die Schutzwirkung der Fructose auf Saccharase und von *Euler* und *Laurin*[2]) über den Einfluß von Rohrzucker auf dieses Enzym von Interesse. In beiden Fällen war die Schutzwirkung auf der sauren Seite geringer als auf der weniger sauren.

Schutzwirkung der Maltose.

In den folgenden Versuchen sollte die Frage beantwortet werden, ob innerhalb gewisser Grenzen eine Beziehung zwischen der Konzen-

[1]) Journ. Amer. Chem. Soc. 82, 988.
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 108, 64, 1919.

tration der Maltose und der Hitzeinaktivierung der Amylase besteht. Zu diesem Zwecke wurde von einer Variierung der Reaktion abgesehen, sondern vielmehr bei der konstanten Reaktion von p_H 4,89, wo die Enzymzerstörung unter der Wirkung der Temperatur erfahrungsgemäß rasch verläuft, durch prozentual gesteigerten Maltosezusatz der Gang der Inaktivierung verschieden stark zu hemmen versucht. Das Reduktionsvermögen der zugesetzten Maltose war genau ermittelt worden und wurde von den erhaltenen Maltosewerten in Abzug gebracht. Die geringen Maltosemengen, welche durch 3 ccm der Enzymlösung in 100 ccm des Reaktionsgemisches bei der Wirksamkeitsbestimmung des noch vorhandenen Enzyms eingebracht wurden, verursachten keine Hemmung des Verzuckerungsverlaufes. Der Gang der Werte (Versuche Nr. 25 bis 29) läßt ohne weiteres eine mit der Maltosekonzentration ansteigende Schutzwirkung auf die Thermoinaktivierung der Amylase erkennen. Die Inaktivierungskoeffizienten $k_{c'}$ als Ordinaten und die Logarithmen der molaren Maltosekonzentration C ergeben, graphisch vereinigt, mit größter Annäherung gerade Linien, welche durch den Koordinatennullpunkt gehen und der Gleichung $\frac{\log C}{k_{c'}}$ = konstant genügen. Auf die graphische Darstellung kann verzichtet werden, die Konstanz der $\frac{\log C}{k_{c'}}$-Wert geht auch aus der folgenden Tabelle mit Deutlichkeit hervor.

Maltosegehalt der Amylaselösung		Inaktivierungskoeffizient $k_{c'}$		$\frac{\log C}{k_{c'}}$		k_{rel}	
Proz.	Mol./Liter	15 Min.	30 Min.	15 Min.	30 Min.	15 Min.	30 Min.
0	0	0,082 25	0,068 93	—	—	100	100
1	0,029 24	0,052 94	0,044 25	28,98	34,67	64,4	64,2
2	0,058 48	0,044 61	0,037 70	27,61	32,71	54,2	54,7
3	0,087 70	0,039 22	0,032 26	26,91	32,76	47,7	46,1
5	0,146 20	0,028 70	0,025 50	29,10	32,75	34,9	36,9
10	0,292 40	0,019 79	0,015 05	26,98	35,48	24,1	21,8
			Mittel:	27,92	33,67		

Wenn man annimmt, daß das Enzym ohne Maltosezusatz maximal, also zu 100 Proz. geschädigt wird, und die $k_{c'}$-Werte mit Maltosezusatz auf die entsprechenden Werte ohne Maltosezusatz bezieht, so erhält man die in der Tabelle angeführten Zahlen k_{rel}, welche das Maß der Inaktivierung prozentual ausdrücken.

Diese starke schützende Wirkung der Maltose auf die Hitzeinaktivierung der Amylase wird am besten durch die Annahme einer Verbindung des Enzyms mit seinem fermentativen Spaltprodukt erklärt. Durch diese Verbindung werden die thermolabilen Gruppen des Enzyms festgelegt.

Inaktivierung der Amylase durch ultraviolette Strahlen.

Als Lichtquelle diente eine 30 cm lange Quarzglas-Uviollampe von *Heraeus*, welche in 10 cm Entfernung senkrecht über der in einer flachen viereckigen Glasschale befindlichen Amylaselösung angebracht war. Die Höhe der Amylaselösung betrug 0,5 cm. Die Glaswanne ruhte in einem geräumigen Temperierbade. Die Versuchsmethodik war sonst die gleiche wie bei der Hitzeinaktivierung. Nach Ablauf gewisser Bestrahlungszeiten wurden kleine Proben entnommen und auf ihre enzymatische Wirksamkeit untersucht. Als Nullwert galt für jeden Versuch die bei der betreffenden Reaktion bestimmte Wirksamkeit der unbestrahlten Amylaselösung.

Die Versuche Nr. 30 bis 33 geben über den zeitlichen Verlauf der Strahlungsinaktivierung Aufschluß. Ähnlich wie bei der Hitzeinaktivierung erfolgt auch hier die Enzymvernichtung anfangs rasch, um dann mit stetiger Verzögerung weiterzugehen. Die Kinetik der Strahlungsinaktivierung verläuft ebensowenig wie die der Hitzeinaktivierung nach einem einfachen Gesetz. Weder das mono- und bimolekulare Gesetz noch die *Schütz*sche Regel lieferten befriedigend übereinstimmende Konstanten.

Was die Bedeutung der ($H^{\cdot}$) auf die Strahlungsinaktivierung anbelangt, so liegt das Maximum der Resistenz des Enzyms bei p_H. 5,14, doch fällt auf, daß die Zone der optimalen Stabilität wesentlich breiter ist als bei der Temperaturinaktivierung. Insonderheit ist der Einfluß stärkerer Säuerung bei der Bestrahlung lange nicht so vernichtend wie bei der Erhitzung des Ferments. Es läßt sich aus allem schließen, daß die Vernichtung der Amylasewirksamkeit durch ultraviolette Strahlung bei weitem nicht derartig von der Reaktion abhängt, wie dies bei der Erhitzung der Fall ist.

Der Temperaturkoeffizient der Bestrahlungsinaktivierung ließ sich aus Versuch Nr. 34 berechnen. Für 15 Minuten Bestrahlungsdauer berechnete sich die *Arrhenius*sche Konstante A zu 4413, für 30 Minuten zu 5033, die zugehörigen Temperaturkoeffizienten $\frac{k_{30}}{k_{20}}$ sind 1,28 bzw. 1,33. Im Gegensatz zur Thermoinaktivierung ist hier also der Einfluß der Temperatur ein sehr geringfügiger. Für die Lichtinaktivierung des Labs ist nach *Schmidt-Nielsen*[1]) der Temperaturkoeffizient noch kleiner, A beträgt nur etwa 1500.

[1]) Zitiert bei *Euler*, Chemie der Enzyme.

Zusammenfassung.

1. Die Hitzeinaktivierung der Malzamylase wird in Acetatgemischen von der Pufferkonzentration beeinflußt. Die höheren Pufferkonzentrationen verschieben die maximale Stabilitätszone etwas nach den höheren p_{H}·-Werten.

2. Gelatine, Eialbumin und Gummiarabikum üben eine Schutzwirkung auf die Thermoinaktivierung der Malzamylase aus, welche vornehmlich bei den höheren p_{H}·-Werten in Erscheinung tritt und zu einer Verflachung der optimalen Stabilitätszone führt.

3. Die Maltose übt einen sehr bedeutenden Schutz auf Hitzeinaktivierung aus, und zwar besteht direkte Proportionalität zwischen dem Logarithmus der molaren Maltosekonzentration und dem Inaktivierungskoeffizienten.

4. Die Inaktivierung der Amylase durch ultraviolette Strahlung erfolgt weder nach dem mono- und bimolekularen Gesetz, noch nach der *Schütz*schen Regel. Sie gleicht hinsichtlich ihrer Kinetik ganz der Thermoinaktivierung. Der Einfluß der (H·) ist viel geringfügiger als bei der Erhitzung, es scheint also die Dissoziation hier eine untergeordnete Rolle zu spielen. Die *Arrhenius*sche Konstante hat für das Temperaturintervall von 20 bis 30° den niederen Wert von 4000 bis 5000, $\frac{k_{30}}{k_{20}}$ ist gleich 1,30. Zwischen der Thermo- und Strahlungsinaktivierung der Malzamylase bestehen also tiefgreifende Unterschiede, beide haben in physikalisch-chemischer Beziehung nichts gemein.

Beilage.

Auszug aus den Versuchsprotokollen.

Versuchsreihe I.

Einfluß der Acetatpufferkonzentration. Temperatur 55,5°; Amylasekonzentration 0,1 proz. Erhitzungszeit 30 Minuten.

Versuchs-nummer	Acetatkonzentration	p_{H}· gemessen	$K \cdot 10^3$	$K \cdot 10^3$ der Nullprobe	Inaktivierungs-koeffizient $k_{c'}$
1	n/10	4,79	0,76	6,01	0,069
2	n/10	5,04	3,60	7,74	0,026
3	n/10	5,64	4,95	7,85	0,015
4	n/10	6,01	3,84	7,74	0,023
5	n/10	6,60	0,21	4,63	0,103
6	n/100	4,89	5,73	9,05	0,015
7	n/100	6,12	0,91	4,77	0,055
8	n/75	6,10	2,06	8,26	0,046
9	n/50	6,05	2,52	8,96	0,043
10	n/20	6,00	3,97	8,15	0,024

Versuchsreihe II. Schutzwirkung von Gelatine, Albumin und Gummiarabikum. Temperatur 55,5°; Amylasekonzentration 0,1proz.; Gelatinekonzentration 1proz.; Albuminkonzentration 2proz.; Gummiarabikum 2 Proz; Acetatpufferkonzentration n/10. Erhitzungszeit 30 Minuten.

Versuchsnummer	Schutzkörper	p_H gemessen	$K \cdot 10^3$	$K \cdot 10^3$ der Nullprobe	$k_{c'}$
11	Gelatine . . .	4,80	1,22	6,25	0,055
12	„ . . .	5,04	3,14	7,75	0,030
13	„ . . .	5,47	4,69	7,55	0,016
14	„ . . .	5,63	5,53	8,40	0,014
15	„ . . .	6,01	4,33	7,80	0,020
16	„ . . .	6,36	3,12	7,74	0,030
17	„ . . .	6,60	1,71	7,24	0,048
18	Albumin . . .	4,80	2,58	7,31	0,059
19	„ . . .	5,64	5,49	8,52	0,015
20	„ . . .	6,36	3,73	8,34	0,027
21	„ . . .	6,60	1,63	7,27	0,050
22	Gummi . . .	4,88	0,58	6,04	0,078
23	„ . . .	5,77	5,40	8,63	0,016
24	„ . . .	6,70	1,12	5,64	0,054

Versuchsreihe III. Schutzwirkung der Maltose. p_H· 4,89 (n/10 Acetatpuffer); Temperatur 55,5°; Amylasekonzentration 0,1 proz. Erhitzungszeit 15 u. 30 Min.

Versuchsnummer	Maltosekonzentration		Erhitzungszeit 30 Minuten			Erhitzungszeit 15 Minuten		
	Proz.	Mol./Liter	$K \cdot 10^3$	$K \cdot 10^3$ der Nullprobe	$k_{c'}$	$K \cdot 10^3$	$K \cdot 10^3$ der Nullprobe	$k_{c'}$
25	1	0,029 24	2,10	7,92	0,044 25	3,58	7,92	0,052 94
26	2	0,058 48	2,52	7,81	0,037 70	4,00	7,81	0,044 61
27	3	0,087 7	3,09	8,14	0,032 26	4,52	8,14	0,039 22
28	5	0,146 2	4,23	9,09	0,025 50	5,91	9,01	0,028 70
29	10	0,292 4	5,80	9,11	0,015 05	6,77	9,11	0,019 79

Versuchsreihe IV. Strahlungsinaktivierung der Malzamylase. Temperatur 20,0°; Amylasekonzentration 0,1proz.; Acetatpufferkonzentration n/10.

Versuchsnummer	p_H gemessen	Bestrahlungszeit Min.	$K \cdot 10^3$	$K \cdot 10^3$ der Nullprobe	$k_{c'}$
30	4,57	30	4,90	8,90	0,019 8
31	5,14	15	6,61	8,94	0,020 1
		30	4,98	8,94	0,019 5
		60	3,01	8,94	0,018 1
32	5,70	15	6,42	9,02	0,022 7
		30	4,49	9,02	0,023 5
		60	2,42	9,02	0,021 9
33	6,10	15	5,76	8,94	0,029 3
		30	4,15	8,94	0,025 6
		60	2,05	8,94	0,024 6
34 [1]	5,17	15	6,45	9,50	0,025 8
		30	4,37	9,50	0,025 8

[1]) Temperatur 30°.

Zur Kritik des üblichen Verfahrens zur Ermittlung des Purinbasengehaltes von Nahrungsmitteln.

Von

Gustav Kollmann.

(Aus der chemischen Abteilung des Wiener physiologischen Universitätsinstituts.)

(Eingegangen am 12. November 1923.)

Nachdem uns seinerzeit das in der Literatur vorliegende Material den Gedanken an die Möglichkeit einer synthetischen Harnsäurebildung auch im Organismus des erwachsenen Menschen nahegelegt hatte, sind wir (1) daran gegangen, diese Möglichkeit durch einen mit aller Sorgfalt durchgeführten Stoffwechselversuch zu prüfen.

Bei einer 50tägigen Beobachtung an einem 26jährigen gesunden Mädchen bei konstanter Ernährung mit sehr purinarmer Nahrung wurde bei Zunahme von fast 4 kg Körpergewicht eine Mehrausscheidung von 15 g Harnsäure über das mit der Nahrung aufgenommene Purinquantum festgestellt, welche anscheinend nicht durch Abbau von kernhaltigem, körpereigenem Zellmaterial ausreichend erklärt werden konnte. Wir haben gezögert, aus dieser Beobachtung weitgehende Schlüsse in bezug auf die Möglichkeit einer Harnsäuresynthese im erwachsenen menschlichen Organismus zu ziehen, da uns Bedenken gekommen sind, ob denn auch wirklich die üblichen Methoden, mit welchen man den Purinbasengehalt von Nahrungsmitteln zu ermitteln pflegt, ausreichend verläßlich sind, und ob nicht vielleicht ein größerer oder kleinerer Bruchteil der in den Kernsubstanzen tierischer und pflanzlicher Gewebe enthaltenen Purinbasen der Bestimmung entgeht. Wenn letzteres der Fall ist, könnte ja natürlich eine Harnsäuresynthese vorgetäuscht werden. Um uns über diese Frage Klarheit zu verschaffen, sind wir daran gegangen, den Purinbasengehalt von möglichst reinen Nucleinsäuren unter Anwendung des bei Untersuchung von Nahrungsmitteln üblichen Abspaltungs- und Fällungsverfahrens zu ermitteln. Die Aufklärung der Konstitution der Nucleinsäuren hat ja im Laufe der letzten Jahre derartige Fortschritte gemacht, daß man weiß, wieviel Purinbasen eine tierische oder pflanzliche Nucleinsäure tatsächlich liefern

muß, vorausgesetzt, daß es gelingt, die Abspaltung quantitativ zu gestalten. Wir haben unseren Berechnungen die Formeln von *Levene* für tierische und pflanzliche Nucleinsäure zugrunde gelegt (2, 3). Es ist *Levene* tatsächlich kürzlich gelungen, bei Spaltung in Methylalkohol suspendierter Nucleinsäure unter Durchleitung von Chlorwasserstoffgas die Spaltung der Nucleinsäure derart vollständig und schonend durchzuführen, daß annähernd die in seinen Formeln postulierte Menge an Purinbasen praktisch in Erscheinung tritt. Leider ist die Anwendung dieses Verfahrens für die Aufspaltung von Nahrungsmitteln praktisch nicht anwendbar, und es ergab sich für uns zunächst die Frage, ob man denn tatsächlich darauf rechnen könne, beim Zerkochen von Nahrungsmitteln mit verdünnter Säure und bei Anwendung des üblichen Purinbasenfällungsverfahrens einerseits durch Kupfersulfat und Natriumbisulfit, andererseits durch ammoniakalische Silberlösung bzw. durch die Kombination beider Vorgänge wenigstens die Hauptmenge der theoretischen Purinbasenmenge praktisch herauszuanalysieren. Aus der *Levene*schen Formel für *tierische Nucleinsäure* ergibt sich ein Molekulargewicht von 1421; von den 15 N-Atomen der Nucleinsäure entfallen auf das Adenin und Guanin zusammen 10 N = 140, so daß man ziemlich genau einen Prozentgehalt von 10 Proz. Purinbasen-N auf ein Molekül Nucleinsäure rechnen darf, derart also, daß 1 g Nucleinsäure theoretisch 0,1 g Purinbasen-N enthält. Die neueste *Hefenucleinsäure*formel *Levenes*, $C_{38}H_{49}N_{15}P_4O_{28}$, mit einem Molekulargewicht von 1287 und einem Gehalt von je einem Molekül Guanin und Adenin (N_{10} ist 140) erfordert einen Gehalt der Nucleinsäure von 10,8 Proz. Purinbasen-N, also für 1 g Hefenucleinsäure 0,108 g Purinbasen-N. Als Material für unsere Untersuchung diente uns teils käufliche Hefenucleinsäure von *Böhringer*, weiter einige Präparate tierischer und pflanzlicher Nucleinsäuren, die wir der besonderen Liebenswürdigkeit des Herrn *P. A. Levene*, New York, Rockefeller-Institut, sowie des Herrn *S. J. Thannhauser*, München, verdanken. Es sei uns gestattet, an dieser Stelle den genannten Herren unseren besonderen Dank auszusprechen.

Unsere Analyse bezieht sich auf folgende Präparate:

1. Hefenucleinsäure von *Böhringer*.
2. „German animal nucleic acid" (*Levene*).
3. Hefenucleinsäure (*Levene*).
4. Tierische Nucleinsäure, nach dem neuesten Verfahren von *Levene* hergestellt.
5. Hefenucleinsäure von *Thannhauser*.

Eine Anzahl zur Kontrolle ausgeführter Stickstoff- und Phosphorbestimmungen ergaben leidliche Übereinstimmung mit der Theorie. Wir finden die N-Werte der Präparate in Übereinstimmung mit *Levenes*

älteren Analysen etwas größer, als die Theorie verlangt. Die Zerlegung der Nucleinsäure geschah mittels Hydrolyse durch verdünnte Schwefelsäure von 1 bis 20 Proz. Wir hatten ursprünglich gehofft, daß die einfache Kupferbisulfitfällung genügen würde, um die Purinbasen von anderen stickstoffhaltigen Hydrolyseprodukten zu trennen. Es stellte sich aber bald heraus, daß dies nicht der Fall ist, daß man vielmehr die Zerlegung des Kupferniederschlages mit Natriumsulfid und die weitere Ausfällung mit ammoniakalischer Silberlösung nicht umgehen kann. Wir nahmen die Kupferfällung zunächst in der Wärme vor; da aber das Reagens als solches beim Erhitzen einen reichlichen Niederschlag absetzt, gelangte man so zu äußerst voluminösen Niederschlägen, welche die weitere Verarbeitung erschwerten. Wir haben uns durch Kontrollversuche davon überzeugt, daß die Fällung in der Kälte dasselbe leistet. Als eine besondere Fehlerquelle ergab sich der Umstand, daß der Kupfersulfidniederschlag sehr große Mengen Purinbasen zurückhält. Man darf es daher nicht versäumen, diesen Niederschlag aufs sorgfältigste mit heißem Wasser zu extrahieren.

Das von uns eingeschlagene Verfahren war schließlich folgendes (4):

Nach dreistündiger Säurehydrolyse wurde mit Natronlauge neutralisiert, mit Essigsäure schwach angesäuert, sodann ein Überschuß von 10proz. Kupfersulfat- und 30proz. Natriumbisulfitlösung zugesetzt. Nach Absetzen des Niederschlages wurde derselbe mit Wasser gewaschen, in einen Kolben gespült und daselbst mit einem Überschuß von 20proz. Natriumsulfidlösung bei Siedehitze zersetzt. Vor dem Filtrieren wurde mit Essigsäure angesäuert, heiß filtriert und mit siedendem Wasser nachgewaschen. Das Filtrat wurde mit 10 ccm verdünnter Salzsäure versetzt, wobei Schwefelabscheidung erfolgte. Dann wurde im Wasserbade eingedampft, der Rückstand mit salzsäurehaltigem Wasser aufgenommen, mit Ammoniak alkalisch gemacht und mit ammoniakalischer Silbermagnesiamischung gefällt. Der Niederschlag wurde nach Austreibung des Ammoniaks durch Kochen mit Magnesia usta kjeldahlisiert. Einige Versuche wurden variiert: die Konzentration der hydrolysierenden Säure, Temperatur, bei der die Fällungen ausgeführt wurden, und die Temperatur des Waschwassers. Wir haben uns ferner in den Filtraten der Kupfer- oder Silberfällung wiederholt überzeugt, etwa auch unter Ersatz des Silbernitrats durch Silberacetat, ob irgend ein Anhaltspunkt dafür vorhanden ist, daß Purinbasen den Fällungen entgehen. Wir haben jedoch keinen solchen gefunden. Wir haben uns auch davon überzeugt, daß in den Filtraten der mit 1proz. Säure hydrolysierten Nucleinsäure bei Wiederholung der Hydrolyse mit höher konzentrierter Säure keine weitere Ausbeute erzielt werden kann. Die Resultate der Analysen sind aus beifolgender Tabelle zu ersehen.

H_2SO_4	Art der Fällung	Nucleins. *Böhringer*	German nucl. acid	Hefe N. S. *Levene*	Tier. N. S. *Levene*	Hefe N. S. *Thannhauser*
1 Proz.	Cu-Fällung	0,094 0,107	0,102	—	—	0,086
1 Proz.	Kombin. Cu—Ag-Fällung	—	—	—	0,063	—
2 Proz.	Cu-Fällung	0,099 6,105	0,110	—	—	0,086
2 Proz.	Kombin. Cu—Ag-Fällung	—	—	—	0,082	—
5 Proz.	Cu-Fällung	0,1088 0,107 0,114	0,100	—	—	0,072
5 Proz.	Kombin. Cu—Ag-Fällung	0,077 0,085	0,078	0,073	0,079	0,089
10 Proz.	Cu-Fällung	0,090 0,91	—	—	—	—
10 Proz.	Kombin. Cu—Ag-Fällung	—	—	—	—	—
20 Proz.	Cu-Fällung	0,083 0,090	—	—	—	—

Die Mehrzahl der mit kombinierter Kupfersilberfällung erhaltenen Resultate liegen zwischen 0,07 bis 0,085 g Purinbasen-N pro 1 g Nucleinsäure, statt des theoretischen Wertes von 0,1 bzw. 0,108. Wir sehen sonach, daß trotz sorgfältigen Arbeitens man im allgemeinen bei diesem Vorgange mit einem Fehlbetrage von 20 bis 30 Proz. zu rechnen hat, ein Fehlbetrag, der unserer Meinung nach nicht sowohl auf eine Unvollständigkeit der Fällung, als vielmehr auf sekundäre Zersetzungsprozesse bei der Hydrolyse zu beziehen sein dürfte.

Wir haben als Stichprobe zur Übertragung dieses Vorganges auf die Analyse von Nahrungsmitteln Doppelversuche einerseits mit Rindfleisch, andererseits mit *Weizenkleie* ausgeführt. Wir finden für Rindfleisch einen Purinbasengehalt von 0,112 gegenüber *Fellenberg* maximal (5) 0,117. Für Weizenkleie finden wir 0,103 gegenüber den *Fellenberg*schen Werten 0,084 bis 0,135. Daß es ganz besonderer Sorgfalt bedarf, angesichts der voluminösen Hydrolysenrückstände, die man beim Zerkochen von kohlehydratreichen Nahrungsmitteln erhält, Verluste zu vermeiden, bedarf keiner näheren Begründung.

Wir folgern aus unseren Untersuchungen, daß die in den verschiedenen Tabellen enthaltenen Angaben über den Purinbasengehalt von Nahrungsmitteln im allgemeinen zu niedrig sein dürften, und daß man dieselben um etwa 20 bis 30 Proz. erhöhen muß, um der Wahrheit einigermaßen nahe zu kommen.

Es fragt sich nunmehr, ob die Mutmaßung, welche wir in unserer früheren Arbeit (l. c.) hinsichtlich einer Harnsäuresynthese im erwachsenen menschlichen Organismus geäußert hatten, durch diesen

Umstand nicht umgestoßen wird. Tatsächlich ist dies, wie die nähere Betrachtung der Versuchswerte lehrt, durchaus nicht der Fall. Es ergibt sich dies ohne weiteres aus dem Umstande, daß der Puringehalt der Nahrung unserer sehr purinarm ernährten Versuchsperson mit höchstens 0,10 g Purin pro Tag veranschlagt worden ist, welcher Zahl ein tägliches Plus von etwa 0,3 g Harnsäureausscheidung im Harn gegenübersteht. (Die Purinbasenausscheidung wurde nicht berücksichtigt, dieselbe würde das Resultat noch in unserem Sinne verbessern.) Selbst wenn wir annehmen, daß die hohen Zahlen *Fellenbergs* für Mehl, Milch und Eier selbst um 50 Proz. erhöht werden würden, so würde noch immer ein Plus von mindestens 0,25 g Purinausscheidung pro Tag über das Ausmaß der mit der Nahrung aufgenommenen Purinmenge resultieren. Da die Versuchsperson an Gewicht zugenommen hatte, demnach das Plus sicherlich nicht auf Rechnung von Abnutzung von körpereigener Zellsubstanz gesetzt werden kann, *gewinnt die Annahme einer synthetischen Purinbildung im Organismus des erwachsenen Menschen an Wahrscheinlichkeit.*

Zusammenfassung.

Werden Nucleinsäuren einer Hydrolyse mit verdünnter Schwefelsäure unterworfen und die Purinbasen sodann nach dem üblichen Vorgange mittels einer Kombination einer Kupferbisulfitfällung einerseits, einer Fällung mit ammoniakalischer Silberlösung andererseits mit möglichster Sorgfalt bestimmt, so gelingt es nicht, mehr als 70 bis 80 Proz. der theoretischen, aus den neuesten Strukturformeln *Levenes* sich ergebenden Menge zu gewinnen. Es scheinen sonach bei diesem Vorgange durch sekundäre Zersetzungsvorgänge bei der Hydrolyse bedingte, nicht unerhebliche Verluste kaum vermeidlich zu sein. Die in den Nahrungsmitteltabellen enthaltenen Angaben für den Puringehalt von Nahrungsmitteln dürften sonach im allgemeinen zu niedrig bemessen sein.

Literatur.

1) *Gustav Kollmann*, diese Zeitschr. **123**, 235, 1921. — 2) *Levene*, Journ. of biol. Chem. **48**, Nr. 1, S. 119—125, Sept. 1921. — 3) *Derselbe*, ebendaselbst **40**, 420, 1919. — 4) Vgl. auch *A. Schittenhelm*, Abderhaldens Handb. d. biochem. Arbeitsmeth. **3**, 893, 1910. — 5) *Fellenberg*, diese Zeitschr. **88**, 331, 1918.

Über den Kohlehydratstoffwechsel von Ascaris megalocephala.

Von

Anton Fischer.

(Aus der chemischen Abteilung des physiologischen Instituts der Wiener Universität.)

(Eingegangen am 12. November 1923.)

Über den Stoffwechsel der Nematoden, die ohne Aufnahme gasförmigen Sauerstoffs leben, sind bisher nur wenige Untersuchungen veröffentlicht worden. Vor allem sind die Arbeiten *Weinlands*[1]) zu erwähnen, in welchen der Kohlehydratstoffwechsel von Ascaris lumbricoides untersucht wurde und dessen Angaben von der einschlägigen Literatur übernommen worden sind.

Weinland hatte gefunden, daß die Außenflüssigkeit, in welcher die Tiere im Hungerzustande bis 7 Tage lebten, in reichlicher Menge eine flüchtige Fettsäure enthält, die er als Valeriansäure betrachtet. Da die Untersuchung des Gaswechsels die gleichzeitige Bildung von CO_2 erwiesen hatte, folgerte *Weinland*, daß der Abbau der Kohlehydrate bei Ascaris lumbricoides nach der Formel $4\ C_6H_{12}O_6 = 9\ CO_2 + 3\ C_5H_{10}O_2 + 9\ H_2$ erfolge. Versuche mit dem *Preßsaft* der Tiere ergaben ebenfalls einen Schwund der Kohlehydrate und die Bildung von Kohlensäure und Valeriansäure im quantitativen Verhältnis der obigen Formel. Es konnte auch gezeigt werden, daß Kohlehydrate, die dem Preßsaft zugefügt worden sind, im selben Sinne abgebaut wurden.

Untersuchungen von *Lesser*[2]) an Regenwürmern ergaben dieselben prinzipiellen Resultate. Er konnte auch zeigen, daß die unter Abschluß von O_2 gehaltenen Tiere mehr Glykogen verbraucht haben als die unter Luftzutritt gehaltenen.

Bei allen diesen Untersuchungen ist ein wesentlicher Punkt unberücksichtigt geblieben, nämlich das Verhalten des Hauptproduktes des normalen Kohlehydratstoffwechsels, der *Milchsäure*. Es mußte

---

[1]) Zeitschr. f. Biol. **42**, **43**.
[2]) Ebendaselbst **52**, **53**.

die Frage beantwortet werden, ob sich die parasitären Würmer anders verhalten als die Wirbeltiere, welche das Glykogen und die übrigen Kohlehydrate über Milchsäure abbauen und deren Muskelglykogen bei der Autolyse unter Umständen[1]) quantitativ in Milchsäure umgewandelt wird.

Um die erste Frage zu beantworten, wurden abgewogene Mengen von lebenden Ascaris megalocephala vom Pferde, die aus dem Schlachthause der Stadt Wien bezogen worden waren, ganz nach dem Vorgange von *Weinland* in einem bestimmten Volumen einer physiologischen Kochsalzlösung in den Brutofen gesetzt. Da die Tiere innerhalb 20 Stunden zugrunde gingen, habe ich es versucht, dieselben in Ringerlösung mit Zusatz von 0,1 Proz. Soda länger am Leben zu erhalten. — In bestimmten Zeiträumen ist eine aliquote Menge der Flüssigkeit nach Aufkochen mit Phenolphthalein titriert und in einem anderen Teil nach *Fürth* und *Charnass* die Milchsäure bestimmt worden. Die Resultate sind in Tabelle I wiedergegeben.

Tabelle I.

Versuche an lebenden Askariden.

Verarbeitete Menge der Askariden g	Dauer des Verweilens im Brutofen Std.	Gesamtacidität ccm n/10 NaOH	Dieselbe, umgerechnet auf Milchsäure	Milchsäure, gefunden nach *Fürth-Charnass*	Phosphorsäure
		umgerechnet auf 100 g Askaris			
31,6	3	31	—	—	—
31,6	20	52	—	—	—
32,2	2	25	0,2	0,036	—
32,2	18	74	0,53	0,038	—
30,8	2	45	0,4	0,036	—
30,8	18	65	0,43	0,038	0,02

Aus dieser Tabelle ist ersichtlich, daß es nicht gelungen ist, die Tiere länger als 20 Stunden lebend zu erhalten. Die Menge der abgegebenen Säure nimmt allmählich zu, die Hauptmenge derselben wird aber bereits im Laufe der ersten Versuchsstunden abgegeben. Die Menge der abgegebenen *Milchsäure* ist dagegen gering und zeigt auffallenderweise keine Zunahme. Die Menge der Phosphorsäure ist gleichfalls unbedeutend.

Eine weitere Anzahl von Versuchen wurde ausgeführt, um den Anteil der Milchsäure an der Gesamtacidität der zu einem Brei verriebenen Tiere festzustellen. Nach der Digestion im Brutschrank unter Toluolzusatz wurden die einzelnen Proben des Breies in physiologischer Kochsalzlösung aufgekocht, filtriert, der Rückstand noch zweimal aufgekocht und filtriert, dann ein aliquoter Teil der Flüssigkeit mit Phenol-

[1]) *Meyerhof*, diese Zeitschr. 128, 594.

phthalein titriert bzw. zur Milchsäurebestimmung verwendet. Durch Kontrollversuche hat sich die vorherige Ausschüttelung mit Amylalkohol, die nach *Fürth* und *Lieben*[1]) ausgeführt wurde, als überflüssig erwiesen. Die Resultate gibt die Tabelle II wieder.

Tabelle II.

Autolyseversuche an Askariden.

Verarbeitete Breimenge g	Dauer der Digestion Std.	Nachbehandlung	Gesamtacidität in 100 g Askarisbrei ccm n/10 NaOH	Milchsäuremenge in 100 g Askarisbrei	
				aus der Gesamtacidität umgerechnet	gefunden nach Fürth-Charnass
20	—	—	34	0,30	—
20	2$^1/_2$	—	38	0,34	—
20	15	—	37	0,33	—
20	45	—	191	1,71	—
20	72	verdampft, Rückstand gelöst in Alkohol	208	1,8	—
50	65	—	184	1,65	1,64
50	65	verdampft, Rückstand gelöst in Wasser	172,8	1,5	1,65
50	76	—	184	1,65	1,26
50	52	—	175,2	1,57	1,16

Aus dieser Tabelle ist ersichtlich, daß das Säuremaximum erst in etwa 50 Stunden erreicht worden ist und im Mittel 1,70 Proz. beträgt (als Milchsäure berechnet). Der größte Teil der gebildeten Säure ist nicht flüchtig und erwies sich bei der Untersuchung als Milchsäure.

Diese Versuche wurden ausgeführt, indem die Tiere in lebendem Zustande in der Fleischhackmaschine zerhackt und zu einem gleichmäßigen Brei verrieben wurden. Es war nun naheliegend, den Anteil der einzelnen Organe an der Säurebildung zu untersuchen. Zu diesem Zwecke wurde eine größere Zahl von Askariden präpariert, der Hautmuskelschlauch mit dem Darm einerseits und die Geschlechtsorgane andererseits gesondert untersucht. Die Resultate sind aus der Tabelle III ersichtlich.

Tabelle III.

Autolyseversuche an den Organen von Askariden.

Bearbeitete Menge	Dauer der Digestion Std.	Gesamtacidität in 100 g Brei ccm n/10 NaOH	Milchsäuremenge in 100 g Brei		Phosphorsäuremenge in 100 g Brei	
			aus der Gesamtacidität umgerechnet	gefunden	gefunden	umgerechnet auf Acidität v. Milchsäure
12,5 g Muskelbrei	16	118	1,06	0,88	0,34	0,38
10,4 g "	40	115	1,04	0,80	—	—
16,3 g Genitalbrei	87	166	1,47	1,23	2,27	2,30

[1]) Diese Zeitschr. 128, 144.

Aus dieser Tabelle folgt, daß die Genitalorgane erheblich mehr Säure und Milchsäure liefern als die Muskulatur. Auffallend ist der hohe Phosphorsäuregehalt der ersteren, die mit der Uranylacetatmethode ermittelt worden ist. Die Muskulatur erreicht das Säuremaximum bereits in 16 Stunden. Die Summe der gefundenen Milchsäure und der Phosphorsäure, die nach den Untersuchungen der *Embden*schen Schule im Muskel zum großen Teil als freie Phosphorsäure gelten kann, genügt vollkommen, um die erreichte Gesamtacidität zu erklären.

Nach einer Methode, die *Otto Löwy*[1]) angegeben hat, ist der Gehalt der Tiere an Gesamtkohlehydraten ermittelt worden. Die Resultate dieser überaus einfachen Methode der Gesamtkohlehydratbestimmung waren recht befriedigend: fünf Bestimmungen am selben Material ergaben (in guter Übereinstimmung mit *F. Flury*, Arch. f. exper. Path. **67**, 283, 1912) einen Gehalt von 2, 2, 2,1, 2,4 und 2,2 Proz. Kohlehydrat im gleichmäßig verriebenen Askarisbrei.

Es waren Versuche in Angriff genommen worden, um die völlige Umwandlung der Kohlehydraten in Milchsäure durch Digestion in einer 1,4proz. Phosphatlösung [nach *Laqueur*[2])] zu untersuchen. Bestimmungen des *Lactacidogens* nach *Embden*[3]) sind ebenfalls vorbereitet worden. An der Fertigstellung dieser Versuche bin ich dadurch verhindert worden, daß durch das Einatmen eines wahrscheinlich in der Cölomflüssigkeit der Askariden gelösten flüchtigen Stoffes sich bei mir zuerst stürmische katarrhalische Erscheinungen der Luftwege, zuletzt eine Art ziemlich heftigen Asthma bronchiale entwickelt haben, welche ein weiteres Arbeiten mit dem Material unmöglich machten. Diese Erscheinungen, die bereits von *Goldschmidt*[4]) im Laboratorium *Boveris* in München in ähnlicher Weise beschrieben worden sind, müssen bei wissenschaftlichen Untersuchungen an Askariden zur äußersten Vorsicht mahnen. Es scheint, wie schon *Goldschmidt* bemerkt, dieselbe beim Arbeiten mit Ascaris megalocephala in noch höherem Grade geboten zu sein als bei Ascaris lumbricoides.

Wenn also die vorliegende Arbeit auch nicht abgeschlossen werden konnte, so lassen es die bisherigen Resultate als recht wahrscheinlich erscheinen, daß bei der Autolyse der Askariden die Kohlehydrate über Milchsäure abgebaut werden und daß flüchtige Fettsäuren bei dem Vorgang keine dominierende Rolle spielen können. Im lebenden Stoffwechsel dieser Tiere wird allerdings eine Säure gebildet, die weder mit der Milchsäure, noch mit der Phosphorsäure identifiziert werden konnte: eine genaue Analyse war bei der kurzen Lebensdauer der

[1]) *Löwy*, Therap. Monatsh., 32. Jahrg., S. 350, 1918.
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **116**.
[3]) Ebendaselbst **118**.
[4]) Münch. med. Wochenschr. 1910, Heft 38.

Tiere nicht möglich. Es spricht für die Richtigkeit obiger Annahme, daß nach Absterben der Tiere der Milchsäuregehalt der Flüssigkeit eine rapide Zunahme zeigte: während solange die Tiere lebten, von der Gesamtacidität der Außenflüssigkeit nur etwa 10 Proz. auf Milchsäure entfallen waren, stieg dieser Prozentsatz nach Absterben der Tiere auf über 50.

Zusammenfassung.

Während nach der Auffassung von *Weinland* der Kohlehydratstoffwechsel der Askariden ein ganz abnormaler sein soll, indem der Zucker einem eigentümlichen Gärungsvorgange unter Spaltung desselben in CO_2, Valeriansäure und Wasserstoff unterliegt, ergab es sich, daß zum mindesten die postmortale Säurebildung auch bei diesen Tieren durch Milchsäure- und Phosphorsäurebildung vollauf gedeckt erscheint. Ein großer Teil der reichlich vorhandenen Kohlehydrate (Glykogen) geht auch ohne Anwendung von Pufferlösungen in Milchsäure über. Daß die im lebenden Zustande von den Würmern nach außen abgegebene flüchtige Substanz von saurem Charakter wirklich Valeriansäure sei, erscheint keineswegs bewiesen und ist infolge der stark reizenden, toxischen Eigenschaften derselben sehr wenig wahrscheinlich.

Weiteres über die Herstellung des Ureasetrockenfermentes und über die Methodik der Harnstoffbestimmung in normalen und pathologischen Harnen.

Von

Giovanni Revoltella (Venedig).

(Aus der chemischen Abteilung des physiologischen Instituts der Wiener Universität.)

(Eingegangen am 12. November 1923.)

Mit 1 Abbildung im Text.

In einer früheren Arbeit[1]) haben wir uns bemüht, zur Herstellung eines Ureasetrockenferments eine einfachere Methode vorzuschlagen, welche infolge ihrer Einfachheit, Billigkeit und Schnelligkeit in jedem Laboratorium Verwendung finden könnte.

Damals hatten wir in Aussicht genommen, einige Fragen, die sich bei unseren Versuchen ergeben hatten, näher zu untersuchen, um sie, soweit uns möglich, zu beantworten.

In der vorliegenden Arbeit teilen wir die Ergebnisse unserer im Laufe des Jahres ausgeführten Versuche mit. Im ersten, allgemeinen Teil wollen wir einige ergänzende Bemerkungen über die *Herstellung unseres Ureaseferments* machen.

Auch auf das Problem, ob durch Anbringung einer der Verdünnung entsprechenden *Korrektur* annähernd vollständige Werte bei der Harnstoffbestimmung zu erreichen wären, soll des näheren eingegangen werden.

Den Abschluß dieses ersten Teiles bildet die Erörterung über den Einfluß der *Verdünnung* auf den Verlauf der Reaktion.

Im zweiten, speziellen Teil wollen wir zuerst eine erhebliche *Vereinfachung* und *Verbesserung* der in unserer Arbeit (l. c.) vorgeschlagenen Methode für die Harnstoffbestimmung mitteilen, wobei wir der Art und Weise der Vornahme der Titration, welche uns als die praktisch wichtigste Fehlerquelle erscheint, besondere Aufmerksamkeit zuwenden werden.

Des weiteren soll eine Modifikation der *Methode zur Bestimmung des Harnstoffs im Harn* besprochen werden, welche, da es dabei möglich ist, alle bisherigen Fehlerquellen auszuschalten, verläßliche und genaue Resultate liefert.

---

[1]) *G. Revoltella*, diese Zeitschr. **134**, 336, 1922.

Daran anschließend, haben wir in *pathologischen* (in geringen Mengen auch in normalen) Harnen vorkommende Stoffe einer Untersuchung unterzogen, um ihre Wirkung auf den Verlauf der Vergärung festzustellen.

Zum Schluß führen wir einige Versuche an, welche den Zweck haben, einen Einblick in den Verlauf der Vergärung in bezug auf *Geschwindigkeit und Vollständigkeit* derselben zu ermöglichen.

I. Teil.

A. Über die Herstellung der Trockenurease.

Im großen und ganzen haben wir nach Erfahrungen von 1½ Jahren keine Änderung der schon seinerzeit veröffentlichten Methode vorzuschlagen. Hier möchten wir nur auf einige Einzelheiten, die uns als praktisch wichtig erschienen, hinweisen, um die Herstellung eines allen Wünschen entsprechenden Ferments zu ermöglichen.

Zuerst möchten wir bemerken, daß unsere Ausführungen, betreffend die *Qualität der Sojabohnen* und der gewonnenen Urease wiederholt Bestätigung gefunden haben, da wir oft mit Sojabohnen gearbeitet haben, bei welchen das Ferment in so geringen Mengen vorhanden war, daß die gelieferte Urease, trotzdem Sojabohnen in doppelter oder dreifacher Menge verwendet worden waren, nicht imstande war, die Vergärung so rasch und vollständig durchzuführen, wie es mit einer Trockenurease aus „guten" Sojabohnen im Parallelversuch möglich war.

Wir versuchten, uns über die Ursache dieser Abweichungen eine Meinung zu bilden, konnten aber leider zu keinem sicheren Ergebnis gelangen. Zuerst hatten wir geglaubt, daß das *Alter* der Sojabohnen im Spiele wäre, aber bald mußten wir diese Meinung aufgeben, da wir selbst und andere auch[1]) uns überzeugen konnten, daß auch alte Sojabohnen imstande sind, dieselbe Menge Ferment zu liefern wie frische. Wir versuchten nun, ob vielleicht nicht das Alter, sondern *äußere Einflüsse* in Betracht zu ziehen wären. Tatsächlich gelang es uns, festzustellen, daß der *Zustand* der Sojabohnen von solcher Wichtigkeit war, daß wir oftmals a priori voraussagen konnten, wo ein gutes bzw. schlechtes Ferment zu erwarten wäre.

Als „gute Sojabohnen" bezeichnen wir erfahrungsgemäß solche, welche *trocken aufbewahrt* worden waren und deren Größe durchschnittlich einer großen Erbse entspricht. Beim Einkauf haben wir die Mischungen von verschiedenen Größen und Farben abgelehnt, weil sie sich als ein schlechtes Material zu erweisen pflegten. Material, das fäulnisverdächtig ist, ist von vornherein abzulehnen. Aus dem Gesagten geht hervor, daß man, bevor man eine beträchtliche Menge Sojabohnen kauft, sich von deren *Ureasegehalt* überzeugen muß. Zu diesem Zwecke setzen wir einem Brei der zu untersuchenden Bohnen eine Harnstofflösung und einige Tropfen Phenolphthalein zu. Ist Urease vorhanden, so bildet sich bald Ammoniak und rötet die Lösung. Dies einfache Verfahren wurde von *Takeuchi, Armstrong, Loevgren*[2]) benutzt und sehr verläßlich gefunden.

---

[1]) *D. H. Wester* konnte in Sojabohnen nach 17- bis 31jähriger Aufbewahrung einen annähernd gleichen Gehalt an Urease feststellen. Pharm. Zentralhalle **61**, 377.

[2]) *Loevgren*, diese Zeitschr. **119**, 215, 1921.

Was die *Methodik* anbelangt, möchten wir nur auf einige Einzelheiten hinweisen, nämlich, daß die fein gemahlenen Sojabohnen in der vorgeschriebenen Wassermenge etwas mehr als 5 oder 6 Stunden belassen werden sollen. Man kann auch so vorgehen, daß man sie über Nacht stehen läßt, um sie am nächsten Tage weiter zu behandeln.

Takeuchi, der Entdecker der Urease der Sojabohnen, 1909, schreibt 1 bis 5 Stunden vor; *Sture Loevgren* (l. c.) findet, daß 2 Stunden genügen. Wir können uns nicht mit dieser Vorschrift einverstanden erklären, und besonders für eine beträchtlichere Sojabohnenmenge empfehlen wir, daß die Wasserextraktion mindestens 8 bis 10 Stunden dauern möge.

Weiter fanden wir es nach der Filtration des Sojabohnenextraktes sehr empfehlenswert, dem Rückstand noch 150 bis 200 ccm Wasser hinzuzufügen, einige Stunden stehen zu lassen und dann wieder zu filtrieren. Für die Filtration, die sonst sehr langsam vor sich geht, benutzten wir meist die Saugpumpe; wir waren aber oft in Ermangelung einer solchen imstande, die Filtration mit den gewöhnlichen Faltenfiltern zu Ende zu führen, ohne eine wesentliche Abschwächung des Ferments zu bemerken.

Bei der Fällung der gesamten Filtratsmenge mit Alkohol fanden wir als Optimum den Zusatz von $^4/_{10}$ an 96proz. Alkohol.

Wir möchten noch vor einem Fehler in der Methodik warnen, nämlich, daß man das Filtrat zu dem Alkohol gießen muß und nicht umgekehrt, weil sonst, wie es uns vorgekommen ist, die Eiweißgerinnung nicht vollständig erfolgt. Zu diesem Zwecke verwendeten wir einen Meßzylinder von etwa 750 bis 1000 ccm. Wir hatten so den Vorteil, daß nach langsamem Zusatz von Alkohol das Gefäß gut verschlossen unter die Wasserleitung gebracht werden kann, was von großer Wichtigkeit ist, zumal wenn man im Sommer arbeitet. Bei diesem Verfahren hat man überdies den Vorteil, daß der Niederschlag schon nach einer Stunde gut geballt am Boden des Gefäßes liegt und die überstehende Flüssigkeit leicht dekantiert oder abgesaugt werden kann. Der Bodensatz soll jedenfalls filtriert werden, damit die richtige Konsistenz, wie bei der ersten Beschreibung der Methode angegeben wurde, erreicht wird. Hier möchten wir noch bemerken, daß wir mit der Zentrifuge, die uns zur Verfügung stand, wegen der allzu geringen Dimensionen derselben, keine sehr befriedigenden Resultate erzielten. Wir sind aber der Meinung, daß mit einer größeren Zentrifuge — unsere acht Zentrifugenröhren faßten nur je 50 ccm — große Vorteile zu erreichen wären, wie insbesondere eine rasche und vollständige Abtrennung des Niederschlages, was von wesentlichem Einfluß auf die Wirksamkeit des Ferments ist. Bei dem ganzen Verfahren ist besonders darauf zu achten, daß die das geronnene Eiweiß enthaltende Flüssigkeit nicht geschüttelt werde, weil die groben Eiweißteilchen sich sonst zerteilen

und eine milchartige Suspension bilden, die eine Filtration schwierig, wenn nicht unmöglich macht, derart, daß ein schwach wirksames Ferment resultiert. Die rasche Eintrocknung des Rückstandes nach Zusatz von Milchzucker wird leicht und vollständig erreicht, wenn man Sorge getragen hat, daß die vorgeschriebene teigartige Konsistenz erreicht worden ist. Die *vollständige Trocknung* empfiehlt sich von selbst. Oft ist es uns vorgekommen, daß wir von sicher „guten Sojabohnen" ein schlechtes Ferment erhalten haben. Wenn die vollständige Trocknung außer acht gelassen worden war, hat die Trockenurease, die gewöhnlich fast geruchlos ist, einen ausgesprochen ranzigen Geruch, und ihre Wirksamkeit nimmt täglich bis zum vollständigen Verschwinden ab. Interessant ist, daß in zwei Fällen, wo diese Urease verwendet wurde, abgesehen von der unvollständigen Vergärung, sich auf der Oberfläche und am Boden der zu vergärenden Flüssigkeit eine netzartige Haut gebildet hat und eine vollständige Trübung der gesamten Flüssigkeit eingetreten ist. Die mikroskopische Untersuchung ergab den Nachweis von Mikroorganismen, was die Ursache der schlechten Vergärung erklärt und die Richtigkeit des Satzes *Oppenheimers*[1]): „Die praktische wichtigste Fehlerquelle (bei der Vergärung) ist die Mitwirkung von Bakterien", bestätigt.

Was die *Dauer der Wirksamkeit des Ferments* anbelangt, können wir heute bestätigen, daß eine Trockenurease, die unserer Vorschrift gemäß hergestellt und aufbewahrt worden war, noch nach einem Jahre keine Abschwächung ihrer Wirkung gezeigt hat.

B. Auswertung der Trockenurease.

Wir setzten einige Proben an, bei welchen die Substratmenge (Harnstoff) in steigender Menge zur Verwendung gelangte, während die Fermentmenge (1 g) und die Wasserbadtemperatur (50^{0}) stets die gleiche waren. Um nun die Titration der verschiedenen Proben nach dem Verweilen im Wasserbade nach genau gleicher Zeit vornehmen zu können und um genaue Vergleichswerte zu gewinnen, durften wir die einzelnen Proben nicht zugleich ins Wasserbad stellen, sondern in solchen Zeitabständen, als erfahrungsgemäß die Titration einer Probe dauerte. Nach einer Stunde wurde mit einem Fünftel der Flüssigkeit der Probe 1 (10 ccm) die nach der Entnahme sofort ins Wasserbad zurückgestellt wurde, gegen Methylorange die gebildete Ammoniakmenge mit n/20 H_2SO_4 bestimmt, und ebenso mit Probe 2 und den übrigen. Nach einer weiteren Stunde wurde nochmals dieselbe Flüssigkeitsmenge titriert usw., bis wir annehmen konnten, daß bei allen Proben der vorgelegte Harnstoff gespalten war. So erhielten wir eine

---

[1]) *Oppenheimer*, Die Fermente, S. 42.

Tabelle, welche die Wertigkeit eines Grammes des entsprechenden Ferments bezüglich der Faktoren: Substrat, Zeit, Temperatur, ausdrückt.

Praktisch verfährt man so:

Da durchschnittlich im Harn pro 100 ccm 1,0 g Harnstoff enthalten ist, stellen wir drei Proben in drei Kolben von 50 ccm Inhalt her. In den ersten bringen wir 5 ccm einer 0,5proz. Harnstofflösung (= 0,025 g Harnstoff), entsprechend einem *niedrigen* Harnstoffgehalt (0,5 Proz.) in 5 ccm Harn; in den zweiten Kolben 10 ccm (= 0,05 g Harnstoff), entsprechend einem durchschnittlich *normalen* Harnstoffgehalt (1,0 Proz.) in 5 ccm Harn; in den dritten 15 ccm (= 0,075 g Harnstoff), entsprechend einem *großen* Harnstoffgehalt (1,5 Proz.) in 5 ccm Harn. Nachdem wir mit destilliertem Wasser den Inhalt der drei Kolben auf 50 ccm ergänzt haben, setzen wir je 1 g der gut gemischten zu prüfenden Trockenurease hinzu, schließen die Kolben mit Gummistopfen und stellen den ersten in ein Wasserbad von 50° Temperatur; nach 3 Minuten sodann den zweiten und noch nach weiteren 3 Minuten den dritten. Eine Stunde nach der Einstellung der ersten Probe titrieren wir 10 ccm mit n/20 H_2SO_4 gegen Methylorange. Nach 3 Minuten dieselbe Flüssigkeitsmenge der Probe 2 und später die der Probe 3.

Sind z. B. die Ergebnisse der Titration folgende:

Probe 1 . . . . . n/20 H_2SO_4 = 3,2 ccm
" 2 . . . . . " " = 5,7 "
" 3 . . . . . " " = 7,5 "

so sehen wir sofort, daß bei der Probe 1 die Harnstoffspaltung vollendet ist, weil

3,2 . 5 . 0,0015 = 0,024 Harnstoff = 96 Proz.

gespalten wurden, nicht aber bei der Probe 2, wo

5,7 . 5 . 0,0015 = 0,0427 Harnstoff = 85,5 Proz.

gespalten wurden, und schon gar nicht bei Probe 3, wo

7,5 . 5 . 0,0015 = 0,0562 Harnstoff = 75 Proz.

gespalten wurden. Während die erste Probe also als fertig (bei Berücksichtigung der Gleichgewichtsreaktion) zu betrachten ist, müssen Proben 2 und 3 noch weiter im Wasserbade verbleiben. Stellen wir nun die Ergebnisse dieser und der weiteren Titrationen in einer Tabelle zusammen, so erhalten wir Tabelle I.

Tabelle I.

	U+ g	Verdünnung ccm	Trockenurease g	Temperatur °C	Nach 1 Std.		Nach 2 Std.		Nach 3 Std.	
					U+ g	Proz.	U+ g	Proz.	U+ g	Proz.
A	0,025	50	1,0	50	0,024	96,0	—	—	—	—
B	0,050	50	1,0	50	0,043	85,5	0,048	96,6	—	—
C	0,075	50	1,0	50	0,056	75,0	0,057	90,0	0,072	96,0

An Hand dieser Tabelle können wir uns ein Urteil über die Wirksamkeit der Trockenurease bilden und, was praktisch wichtig ist, für eine beliebige Harnstoffmenge bis 0,075 g mit Sicherheit voraussagen, wann ihre *Vergärung vollendet* sein wird, und andererseits schon bei der ersten Titration einer unbekannten Harnstofflösung vor vollständiger Vergärung voraussagen, wieviel Harnstoff ungefähr darin enthalten ist. Doch nur

dann, wenn die Bestimmungen unter gleichen Umständen (Zeit, Temperatur, Ferment) durchgeführt worden sind. Später werden wir noch auf den Vorteil dieses Verfahrens zurückkommen. Wir haben es bei jeder neuen Trockenurease, die wir zum Zwecke unserer Untersuchungen hergestellt haben, verwendet, und haben immer befriedigende Resultate erhalten.

C. Korrektur und Bewertung der Endresultate.

Schon bei unserer vorigen Arbeit haben wir bemerkt, daß die Spaltung des Harnstoffs durch Urease *nicht vollständig* erfolgt. Ähnliches hat auch *Wahlmann*[1]) beobachtet. Doch gaben wir der Hoffnung Ausdruck, „daß es möglich wäre, eine der Menge der Trockenurease und der Zeit entsprechende Korrektur anzubringen" (l. c.). Nun stellten wir uns die Aufgabe, diese Korrektur zu ermitteln; zu diesem Zwecke nahmen wir eine Reihe Untersuchungen vor, und es sei uns gestattet, aus unseren Protokollen einige Versuche mitzuteilen, welche unter denselben Umständen, wie die bereits veröffentlichten, durchgeführt worden sind.

Bei einer und derselben Temperatur von 37° haben wir diese erste Versuchsserie so durchgeführt, daß wir bei der ersten Versuchsreihe eine Substratmenge gleich 1, bei der zweiten eine Substratmenge gleich 2, bei der dritten eine Substratmenge gleich 3 verwendeten. Bei jeder Versuchsreihe wurde mit derselben Substratmenge die Wirkung von steigenden Trockenureasemengen nach verschiedenen Zeiten untersucht. Die einzelnen Proben wurden mit minutiöser Genauigkeit hergestellt. Bei allen Versuchen wurden Gefäße von genau 200 ccm Inhalt verwendet, welche mit Glasstopfen verschließbar waren. Bei sämtlichen Versuchen wurde auch dieselbe Menge Toluol verwendet (5 ccm). Die benutzten Pipetten waren immer dieselben. Bei jeder Harnstofflösung, die wir herstellten, verließen wir uns nicht auf die Richtigkeit der abgewogenen Mengen, sondern nur auf die Ergebnisse mindestens dreier, mit der größten Sorgfalt nach *Kjeldahl* durchgeführten Stickstoffbestimmungen. Zwischen diesen Werten und denen der Einwägungen fanden wir immer eine Differenz, welche nach dem Ursprung des Harnstoffs verschieden war. Wir fanden z. B. bei dem Harnstoff, den wir aus der Heilmittelstelle Wiens in Originalpackung bekommen hatten (in dieser Zeit war in Wien weder von *Kahlbaum* noch von *Merck* Harnstoff zu bekommen) folgende Differenz:

1. März 1923. Eingewogen 54,4319 g Harnstoff (2 Tage lang über Schwefelsäure im Vakuum aufbewahrt).

Destilliertes Wasser bis 500 ccm.

Titer der Lösung 10,886 g-Proz.

$$5 \text{ ccm} = 0{,}544 \text{ g}. \tag{1}$$

Stickstoffbestimmung nach *Kjeldahl* in 5 ccm der Lösung.

$$\left.\begin{array}{llll} 1.\ n/10\ H_2SO_4 & 177{,}1 = & \text{Harnstoff} & 0{,}5313\text{ g} \\ 2.\ \ ,, \quad ,, & 176{,}9 = & ,, & 0{,}5307\text{ g} \\ 3.\ \ ,, \quad ,, & 177{,}0 = & ,, & 0{,}5310\text{ g} \end{array}\right\} = 0{,}531\text{ g} \tag{2}$$

[1]) *Wahlmann*, Ned. Tischr. von Geneesk **64**. 1920.

Wenn wir nun die Differenz zwischen (1) und (2) in Prozenten rechnen, so finden wir, daß (2) um 5,9 Proz. kleiner ist als (1).

Zu genau demselben Resultat kamen wir bei der Herstellung anderer Lösungen mit demselben Harnstoffpräparat.

19. April 1923. Eingewogen 20,331 g Harnstoff (wie oben aufbewahrt). Destilliertes Wasser bis 400 ccm.

Titer der Lösung pro 10 ccm = 0,5082 g. (1)

Stickstoffbestimmung nach *Kjeldahl* in 10 ccm der Lösung:

1. n/10 H_2SO_4 161,2 = Harnstoff 0,4836 g
2. „ „ 159,5 = „ 0,4746 g
3. „ „ 159,3 = „ 0,4779 g
4. „ „ 159,0 = „ 0,4770 g

} = 0,4782 g (2)

Auch diesmal ergibt die Differenz zwischen (1) und (2) also 5,9 Proz. Als wir später Harnstoff von *Kahlbaum* bekamen, führten wir auch mit diesem die Stickstoffbestimmungen durch, und entsprechend unseren Erwartungen fanden wir, daß auch hier ein Unterschied zwischen Einwägung und Endbestimmung bestand, doch war derselbe bedeutend kleiner als bei dem ersten Harnstoff, nämlich nur — 1,7 Proz.

Daß die Harnstofflösungen nach Stickstoffbestimmung richtig waren, bestätigte die Tatsache, daß bei den Bestimmungen mittels unseres später erwähnten *Destillationskontrollapparates* (D. K. A.) nach vollzogener Vergärung fast 100 Proz. des vorgelegten Harnstoffs als Ammoniak gefunden wurde. In der Literatur über Urease finden wir nur die Angaben *Sture Loevgrens*[1]), welcher seine Harnstofflösungen auf ihre Richtigkeit kontrollierte. Er fand z. B., daß der Harnstoff der ihm zur Verfügung stand, einen Schmelzpunkt von 130 statt von 132° hatte. Bei Versuch 52 (l. c.) fand er, daß die Lösung um 0,7 Proz. schwächer war. Er sah sich deshalb gezwungen, mit Berücksichtigung dieser Umstände seine Versuche vorzunehmen.

Die Resultate unserer Versuche ergeben sich aus den Tabellen II, III und IV.

Tabelle II.

	U+ g	Verdünnt auf	Trockenurease	Temperatur	Nach 4 Std.		Nach 8 Std.		Nach 24 Std.		Nach 48 Std.		Nach 72 Std.	
					U+ g	Proz.	U+ g	Proz.	U+ g	Proz.	U+ g	Proz.	U+ g	Proz.
A	0,531	200	1 g	37°	0,3021	56,7	0,4503	85,5	0,5016	94,2	0,4959	93,1	0,4959	93,1
B	0,531	200	2	37	0,4161	78,1	0,5016	94,2	0,5016	94,2	0,4959	93,1	0,4902	92,0
C	0,531	200	3	37	0,4446	83,5	0,5016	94,2	0,5016	94,2	0,4959	93,1	0,4902	92,0

Tabelle III.

A	1,062	200	1 g	37°	0,3363	31,6	0,4845	45,6	0,7011	66,0	0,8493	71,9	0,912	85,9
B	1,062	200	2	37	0,4275	40,2	0,7296	68,7	1,009	95,0	1,009	95,0	1,0032	94,5
C	1,062	200	3	37	0,6213	58,5	0,8721	82,1	1,0146	95,5	1,009	95,0	1,0032	94,5

Tabelle IV.

A	1,593	200	1 g	37°	0,3021	18,9	0,4902	29,7	0,969	60,7	1,1015	69,6	1,1571	72,4
B	1,593	200	2	37	0,4845	30,3	0,8208	51,4	1,425	89,2	1,5105	94,6	1,4991	93,8
C	1,593	200	3	37	0,7239	45,3	1,026	64,3	1,5105	94,6	1,5105	94,6	1,4934	93,5

[1]) *Sture Loevgren*, diese Zeitschr. **137**, 210, 1923.

Aus sämtlichen Tabellen geht hervor, daß durchschnittlich die Endresultate den Resultaten unserer früheren Versuche entsprechen. Damals (l. c., Tabellen I und II) fanden wir Schwankungen, welche auf dem höchsten Punkt der Vergärung berechnet, ihre Grenze zwischen 94,8 (Tabelle I, Nr. 4) und 96,0 Proz. (Tabelle II, Nr. 6) hatten; demnach wird durchschnittlich das Gleichgewicht um den Wert von 95,4 Proz. des gespaltenen Substrats erreicht; das bedeutet aber, daß etwa 4,6 Proz. der gesamten Substratsmenge nicht umgewandelt werden und infolgedessen nicht als Ammoniumcarbonat bei unserer Titration erscheinen.

Bei der neuen Versuchsserie kommen wir fast zu denselben Resultaten, und wenn wir die höchsten Punkte der Vergärung betrachten, finden wir folgendes:

Tabelle II	B . . .	94,2	94,2	94,7 Proz.
	C . . .	94,2		
Tabelle III	B . . .	95,0	95,2	
	C . . .	95,5		
Tabelle IV	B . . .	94,6	94,6	
	C . . .	94,6		

Der Unterschied zwischen dem Endresultat dieser und den früheren Versuchen ist nun:

$$95{,}4 - 94{,}7 = 0{,}7 \text{ Proz.}$$

Wir halten aber an den Ergebnissen unserer jüngsten Versuche fest, weil sie unter besseren Verhältnissen mit vollständiger Beherrschung der Technik und mit Ausschaltung einiger früher unvermeidlicher Fehlerquellen durchgeführt worden sind. *Und so glauben wir berechtigt zu sein, bei Bestimmungen, welche mit Trockenurease nach unserem alten Verfahren durchgeführt werden, als Korrektur:*

$$\mathbf{100 - 94{,}7 = 5{,}3 \text{ Proz.}}$$

der gesamten Menge des umgesetzten Harnstoffs vorzuschlagen, welche zu dem Endresultat der Titration nach vollständiger Vergärung zu addieren ist, um den genauen Harnstoffgehalt der untersuchten Flüssigkeit zu erhalten.

Die vorliegenden Tabellen geben uns Veranlassung, auch anderes kurz zu bemerken. Wie schon früher bei der Berechnung der Korrektur vielleicht bemerkt wurde, haben wir nicht bei allen drei Versuchsreihen die Resultate der Zeile A angebracht, weil die Vergärung in solchen Fällen wegen der unzureichenden Trockenureasemenge unvollständig war. Wenn wir die Versuche weiter fortgeführt hätten, hätten sie sicher auch ihr Gleichgewicht erreicht. Praktisch aber hätten wir vielleicht dieses Gleichgewicht nicht erreichen können, weil sich bei der langen Dauer der Reaktion andere Faktoren (Bakterien, Verluste usw.) geltend gemacht und die Erlangung des richtigen End-

resultates verhindert hätten. Auf Grund unserer Beobachtung können wir auf zwei praktisch wichtige Ergebnisse schließen. Erstens, daß wir bei der Vergärung einer bestimmten Harnstoffmenge eine *entsprechende Fermentmenge verwenden* müssen, zweitens, daß wir nach Möglichkeit das *Eindringen von Bakterien* in die zu vergärende Flüssigkeit während der Reaktion verhindern müssen.

Noch eine Frage wollen wir nun behandeln, nämlich die Frage nach dem *Rückgang der Werte* der Resultate unserer Harnstoffbestimmungen, die aus sämtlichen Tabellen ersichtlich sind.

Marshall[1]) fand als erster für die Urease, daß die Aktivität mit der Verdünnung zunimmt, um bei weiterer Verdünnung wieder zu sinken. *Sture Loevgren*[2]) in seiner ersten umfangreichen Arbeit über Urease kam auch zu demselben Schluß. Wir entnehmen seiner Arbeit folgende Tabelle, die am besten dieses Phänomen zeigt.

(Tabelle 14, S. 251. Nach 60 Minuten bei 17°.)

Totalvolumen .	2	8	16	32	48	64	56	128
Ammoniak . .	8	10,6	12,1	13,2	14,8	16,1	16,6	15,7

Auch *Wester*[3]) bestätigte diese Ergebnisse. *Jacoby* und *Umeda*[4]) sind zu entgegengesetzten Resultaten gekommen, und während sie bei einem Totalvolumen von 32 ccm 0,85 bis 0,98 n/1 Ammoniak fanden, fanden sie bei einer Verdünnung gleich 40 nur 0,48 bis 0,45. Hinsichtlich der Erklärung dieses Widerspruchs sind wir völlig mit *Sture Loevgren* (l. c.) einverstanden, der die vorigen Resultate auf eine unzureichende Methode zurückführt. Die Destillation wurde mittels eines Dampfstromes durchgeführt, und die dabei erfolgende Hydrolysespaltung des Harnstoffs nicht ausreichend beachtet.

Früher waren wir der Meinung, daß das *Toluol* außer der schützenden Wirkung gegen das mögliche Eindringen von Bakterien auch ein Hindernis für das Freiwerden von Ammoniak bilde. Als wir aber, besonders bei vorgeschrittener Vergärung aus der Oberfläche der mit Toluol bedeckten Flüssigkeit, die Entwicklung von Ammoniakdämpfen feststellen konnten, untersuchten wir, ob der oben erwähnte *Rückgang der Werte* auf dieses *Entweichen von Ammoniak* zurückzuführen sei oder vielleicht, wie *Barendrecht*[5]) glaubte, auf eine *Rückbildung des Spaltproduktes.*

Barendrechts kürzlich veröffentlichte Arbeit über die direkte Synthese des Harnstoffs durch Urease sucht den Nachweis zu erbringen, daß die Reaktion mittels Urease nach der Richtung:

$$(NH_4)_2CO_3 \longrightarrow CO{<}^{NH_2}_{NH_2} + 2\,H_2O$$

verlaufen kann.

---

[1]) *Marshall,* Journ. of biol. Chem. **17**, 351, 1914.

[2]) *Sture Loevgren,* diese Zeitschr. **119**, 215, 1921.

[3]) *Wester,* Pharm. Zentralhalle **57**, 423, 1910.

[4]) *Jacoby* und *Umeda,* diese Zeitschr. **68**, 23, 1915.

[5]) *Barendrecht,* Rec. Trav. Chem. des Pays Bas **39**, 495, 1920.

Davon ausgehend, stellten wir Versuche an, um *Verluste von Ammoniak* zu verhindern. Wir verschlossen jeden Kolben, den wir für unsere Untersuchungen verwendeten, mit Paraffin und verbanden ihn mit einer Gaswaschflasche als Vorlage. Hatten sich aus dem die zu vergärende Flüssigkeit enthaltenden Kolben Ammoniakdämpfe entwickelt, so mußten sie von der in der Vorlage enthaltenen Säure aufgefangen werden. Bevor wir nach der bestimmten Zeit an die Titration der Flüssigkeit gingen, leiteten wir auch die Luft, welche in den Gefäßen enthalten war, in die Säure über, damit auch eventuelle Spuren von Ammoniak in dieser Luft in Betracht gezogen werden könnten. In der Tabelle V bringen wir die Ergebnisse unserer Versuche.

Zum besseren Verständnis derselben möchten wir anführen, daß drei Proben mit gleicher Menge Ferment in den Thermostaten bei 37° gestellt wurden; an einer Probe nach der anderen wurde nach bestimmter Zeit die Titration durchgeführt.

Tabelle V.

	U+ g	Verdünnt auf	Trockenurease	Temperatur	Nach 24 Std.		Nach 48 Std.		Nach 72 Std.		Vorlage n/10 H_2SO_4	Rücktitriert	Frei gew. NH_3	
					U+ g	Proz.	U+ g	Proz.	U+ g	Proz.			g	Proz.
A	1,062	200	2 g	37°	1,0089	95,0	—	—	—	—	10	10	—	—
B	1,062	200	2	37	—	—	1,0032	94,5	—	—	10	8,5	0,0045	0,40
C	1,062	200	2	37	—	—	—	—	1,0032	94,5	10	8,3	0,0051	0,48

Aus dieser Tabelle geht deutlich hervor, daß tatsächlich auf einen Ammoniakverlust geschlossen werden kann. Die Frage, ob auch eine reversible Reaktion im Spiele ist oder nicht, lassen wir offen, weil wir keine Untersuchung in dieser Richtung unternommen haben.

Nach *Barendrecht* (l. c.) beträgt der durch Synthese verursachte Rückgang 10 pro 2486 = 0,40 Proz. gegenüber 0,45 Proz. in unseren Versuchen. Übrigens hat *Mataar*[1]) die Behauptung *Barendrechts* nicht bestätigen können und obige Frage verneint.

Als Hauptergebnis dieser Versuchsreihe ergibt sich aber eine Bestätigung unserer früheren Vermutung, daß der *Verlauf der Reaktion nicht zur vollständigen Umsetzung des Substrats führt, sondern daß es sich um eine typische Gleichgewichtsreaktion handelt, welche die Vergärung bis etwa 94,7 Proz. unter den angegebenen Verhältnissen ermöglicht.*

Nach obigem Verfahren hatten *Armstrong* und *Hortung*[2]) und Mitarbeiter, sowie *M. Jacoby* und *Sugga*[3]) ihre Harnstoffbestimmungen durchgeführt; die letzteren folgerten aus den Ergebnissen dieser Versuche, daß

[1]) *Mataar*, Rec. Trav. chim. des Pays Bas **39**, 495, 1920.
[2]) *Armstrong*, Proc. Royal Soc. London **85**, 109, 1912.
[3]) *Jaocby* und *Sugga*, diese Zeitschr. **69**, 116, 1915.

man bis 100 Proz. des Substrates spalten könne. Diese Resultate stimmen aber mit den unsrigen nicht überein. Da sie aber nach der Vergärung das gebildete Ammoniak mittels strömenden Dampfes in Säure aufgefangen haben, halten wir es nicht für ausgeschlossen (hohe Temperatur), daß gerade durch Verwendung des Dampfstromes die vollständige Spaltung des Harnstoffs zu erklären ist.

D. Einfluß der Verdünnung auf den Verlauf der Vergärung.

Wir fanden bei unserer vorigen Arbeit, daß der Verlauf der Vergärung bis zu einem gewissen Grade von der Verdünnung abhängig ist. Die Reaktion verläuft nämlich etwas rascher und, was wichtiger ist, vollständiger als bei einer unverdünnten Lösung.

Ein Blick auf die Tabelle VI wird die Tatsachen leicht ersichtlich machen.

Tabelle VI.

	U+ g	Verdünnt auf	Trocken-urease	Temperatur	Nach 4 Std.		Nach 8 Std.		Nach 24 Std.		Nach 48 Std.		Nach 72 Std.	
					U+ g	Proz.	U+ g	Proz.	U+ g	Proz.	U+ g	Proz.	U+ g	Proz.
A	1,062	400	1 g	37°	0,3306	31,1	0,513	48,3	0,8684	81,6	1,0032	94,5	0,9975	93,9
B	1,062	400	2 g	37	0,4389	41,3	0,7695	72,4	1,0089	95,0	1,0089	95,0	0,9975	93,9
C	1,062	400	3 g	37	0,6156	58,0	0,9120	85,9	1,0089	95,0	1,0089	95,0	1,0032	94,5

Aus dieser Tabelle geht hervor, daß der Reaktionsverlauf viel rascher wie bei dem unter gleichen Umständen durchgeführten Versuch der Tabelle III vor sich geht.

Von diesen Ergebnissen ausgehend, werden wir später eine Abänderung in der Methode für die Harnuntersuchung vorschlagen. Auf eine Erklärung des Verlaufes der Reaktion bei verdünnten Proben möchten wir hier nicht eingehen (vgl. darüber *Loevgren*, l. c.).

II. Teil.

Verbesserte Methodik der Harnstoffbestimmung mittels Urease.

A. Direkte Harnstoffbestimmung.

Zwei Portionen zu je 5 ccm filtrierten frischen Harns werden mit zwei Tropfen Methylorange[1]) in je zwei kleinen Meßkolben zu 50 ccm eingebracht und mittels n/20 H_2SO_4 bis zur schwach Orangefarbe titriert. Die verwendete Säuremenge entspricht der sogenannten nativen Alkaleszenz des Harns, die für unsere Bestimmung von keinem weiteren Interesse ist. Falls der Harn pigmentreich ist oder falls er pathologische Pigmente enthält, kann er zum Zwecke der Titration

[1]) Die Methylorangelösung, die uns zur Verfügung stand, war die gewöhnliche 1 : 100, welche wir noch auf 1 : 300 verdünnten. Zwei Tropfen genügen für die Feststellung der Neutralisierung und für die später nach der Vergärung vorzunehmende Titration.

bis zum Vier- bis Fünffachen verdünnt werden, was die Titration manchmal entschieden erleichtert. Der gegen Methylorange neutralisierten Flüssigkeit der beiden Kolben wird nun eine bestimmte Menge Ferment (je nach der Stärke des zur Verfügung stehenden Präparates und je nach der Geschwindigkeit, die man bei der Vergärung verlangt, 0,25, 0,5 oder 1,0 g) hinzugefügt und die gesamte Flüssigkeit bis zur Marke mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Die Kolben werden nun mit ihrem Glasstopfen verschlossen und in ein Wasserbad, welches auf einer Temperatur von 45 bis 50° (nicht höher) gehalten wird, gestellt.

Anstatt langhalsiger Meßkolben, die sehr kostspielig sind, kann man auch die gewöhnlichen kleinen 50-ccm-Rundkolben verwenden, die man selbst eichen kann. Solche Kolben bieten den Vorteil, daß man solche wählen kann, welche so mit dem Gummistopfen verschließbar sind, daß über der zu vergärenden Flüssigkeit nur ein ganz kleiner Luftraum vorhanden ist.

Nach einer Stunde werden aus einem der Meßkolben 10 ccm Flüssigkeit abpipettiert und in einen kleinen Rundkolben von 30 bis 50 ccm Inhalt gebracht, sodann mit n/20 H_2SO_4-Lösung bis zu ganz schwacher Orangefarbe titriert[1]).

Hatte man schon die Wirksamkeit der entsprechenden Fermentmenge auf die im ersten Teile vorliegender Arbeit erwähnte Weise festgestellt und kann man aus dem Resultat der Titration entnehmen, daß die Vergärung nicht vollständig ist, so wird der zweite Kolben weiter im Wasserbade belassen, und je nach den Ergebnissen der ersten Titration nach einer halben, einer oder mehreren Stunden die endgültige Titration durchgeführt.

Die zur Neutralisierung verbrauchten Kubikzentimeter Säure entsprechen der Anzahl Kubikzentimeter n/20 Ammoniak, die sich aus der Spaltung des Harnstoffs *eines Kubikzentimeters* Harns gebildet haben.

Die Berechnung erfolgt sehr einfach, indem die erhaltene Zahl, mit 0,15525 multipliziert, in *Grammen* die *schon korrigierte* Harnstoffmenge von **100 ccm** des entsprechenden Harns ergibt[2]).

Soll die der Harnstoffmenge entsprechende Menge Stickstoff ermittelt werden, so braucht man nur die bei der Titration gefundene Zahl mit 0,07245 zu multiplizieren und erhält so die entsprechende

---

[1]) Über die Durchführung der Titration wird weiter unten gesprochen.

[2]) Bezüglich der Korrektur von 3,5 Proz. s. unten. Die Berechnung obigen Faktors erfolgt, wenn x die zu ermittelnde korrigierte Harnstoffmenge in 100 ccm Harn, a die Zahl Kubikzentimeter, die man bei der Titration ermittelt hat, und $b = (0{,}0015 \,.\, 100) = 0{,}15$ ist, folgendermaßen:

$$x = a \cdot b + \frac{a \,.\, b}{100} \cdot 3{,}5 = a \cdot b \left(1 + \frac{3{,}5}{100}\right) = a b \cdot \frac{103{,}5}{100} = a \cdot \frac{103{,}5 \,.\, 0{,}15}{100}$$
$$= x = a \,.\, 0{,}15525.$$

Stickstoffmenge *in Grammen* pro 100 ccm Harn und auch schon mit Berücksichtigung der Gleichgewichtskorrektur.

A. Hahn und *J. Saphra*[1]) verfahren bei ihrer Methode für die Harnstoffbestimmungen im Harn so, daß sie in einen 50-ccm-Kolben 1 ccm Harn + Wasser + Ferment + Toluol, in einen zweiten eine gleiche Menge Harn + Wasser und Toluol, aber kein Ferment einbringen. Die nach 20 Stunden gefundenen Werte bei der Titration der Flüssigkeit des ersten Kolbens, vermindert um den Wert, den sie bei der Titration des zweiten erhielten, ergeben nach den Verfassern die Harnstoffmenge von 1 ccm Harn. Wir möchten bemerken, daß Toluol nicht imstande ist, eine Vergärung zu verhindern, falls der Harn harnstoffspaltende Bakterien schon vorher enthalten hat! Daher kann die bei der zweiten Probe enthaltene Harnstoffmenge gespalten werden, was zur Folge hat, daß die bei der Titration gefundene Alkaleszenz einen höheren Wert repräsentiert, als ihr in Wahrheit entspricht. Das Endresultat ergibt daher *kleinere* Harnstoffwerte, als sie in Wirklichkeit sein sollten.

Unsere Methode ist sehr einfach, verlangt aber eine gewisse Sorgfalt, um Fehler zu vermeiden, welche in Hinsicht auf die kleine Menge (1 ccm) Harn, mit welcher die Titration durchgeführt wird, bei der Umrechnung 100mal vergrößert würden. Die Anwendung von noch kleineren Mengen Harn möchten wir widerraten, da vorkommende Fehler sich bei der Berechnung des Endresultates so weit steigern können, daß ganz unbrauchbare Resultate entstehen, was bei dem Verfahren von *Rose* und *Colemann*[2]) z. B. leicht vorkommen kann.

Bei dieser Methode verlangen Verfasser, daß bei der Vergärung nicht mehr als 2 mg Stickstoff auftreten sollen! Rechnen wir nun, daß durchschnittlich im Harn ungefähr 1 g Harnstoff pro 100 ccm enthalten ist, so sehen wir, daß die Bestimmung in einem sehr kleinen Bruchteil eines Kubikzentimeters durchgeführt werden muß, und daß infolgedessen ein möglicher Fehler ins Ungemessene vergrößert werden müßte.

Wir möchten nun einige *Fehler* erwähnen, die man bei der Titration leicht begehen kann:

a) Verdünnungsflüssigkeit.

Daß für die Verdünnung der zu untersuchenden Flüssigkeit nur *destilliertes Wasser* in Betracht kommt, ist leicht verständlich, wenn man sich die verschiedenen H-Ionenkonzentrationen bei destilliertem und nicht destilliertem Wasser vor Augen hält. Da Methylorange seinen Umschlagpunkt bei $p_H = 4{,}5$ hat, erhalten wir, wenn wir Leitungswasser verwenden, welches nach *Michaelis*[3]) ein $p_H = 7{,}4$ hat, höhere Werte, als wenn wir destilliertes Wasser, dessen $p_H = 5$ bis 6 ist, zur

[1]) *A. Hahn* und *Saphra*, Deutsch. med. Wochenschr. 1914, S. 430.

[2]) *Rose* und *Coleman*, A Micro-Urease-Method for the Determination of Urea. Biochem. Bull. 3, 411.

[3]) *L. Michaelis*, Die Wasserstoffionenkonzentration. Berlin 1914.

Verdünnung verwenden. *Eine vorherige Prüfung des destillierten Wassers, das man verwendet, empfiehlt sich danach von selbst.*

b) Titrationsmethoden.

Bei der Titration des durch die Vergärung gebildeten Ammoniakcarbonats ist verschiedenes zu beachten. Wir geben im folgenden kurz die Methoden an, die wir auf Grund unserer Erfahrungen als die besten bezeichnen können.

Nach der zur Vergärung nötigen Zeit wurde aus den die vergorene Flüssigkeit enthaltenden Kolben vorsichtig und unter Vermeidung von Schütteln mittels der Pipette 10 ccm Flüssigkeit abgesaugt, wobei zu beachten war, daß nicht mit der Spitze der Bodensatz aufgerührt und eine Trübung der zu titrierenden — sonst wasserklaren — Lösung hervorgerufen wurde. Die abgesaugte Flüssigkeit wurde nun langsam eingelassen, indem die Spitze der Pipette an den Boden des Kolbens gesetzt wurde, in welchem die Titration vorgenommen werden sollte. Die Titration wurde sogleich ausgeführt, indem von der n/20 H_2SO_4 so viel in die nicht *geschüttelte* zu titrierende Flüssigkeit der Wand entlang einfließen gelassen wurde, bis das Methylorange einen deutlichen Umschlag in Rot zeigte. Nun erst wurde die Flüssigkeit geschüttelt und bei der Rücktitration der genaue Umschlagspunkt festgestellt.

Eine andere Methode, die wir wiederholt mit dem besten Erfolg verwendet haben und welche wir zum systematischen Gebrauch wärmstens empfehlen möchten, ist folgende: In dem zur Titration in Verwendung kommenden Kolben wurde eine genau abgemessene, für die Titration notwendige n/20 Säuremenge nebst einem Überschuß eingebracht, in diese die Spitze der mit der zu analysierenden Flüssigkeit gefüllten Pipette eingetaucht und die Flüssigkeit einlaufen gelassen. *Bei diesem Verfahren ist sicherlich jeder Ammoniakverlust absolut ausgeschlossen.* Die Bestimmung von Ammoniak wird durch Rücktitration vorgenommen.

Was die Titration mit Methylorange, welche ernste Schwierigkeiten bietet, anbelangt, möchten wir folgendes sagen: Da die Erkennung des richtigen Umschlagpunktes schwer ist und manchmal zu falschen Resultaten führen kann, haben wir folgendes Verfahren eingeschlagen: Sobald wir bei der Titration unsere Probe mit der Rücktitration in die Nähe des Umschlagpunktes gelangt waren, stellten wir folgende Vergleichslösung her: in einem gleich großen Kolben wurden 10 ccm desselben vergorenen Harns mit so viel destilliertem Wasser versetzt, daß die Gesamtmengen beider Proben gleich waren. Nun wird, da die Indikatormenge und die Verdünnung bei beiden Proben gleich ist, es auch dem Ungeübten möglich sein, mit dieser Vergleichslösung bis auf den Tropfen genau die Titration durchzuführen.

Noch etwas bezüglich der Verwendung von *Schwefelsäure* bei der Titration: *Naumann* und *Rücker*[1]) folgerten aus den Ergebnissen ihrer Untersuchungen der Hydrolyse der Ammonsalze und aus maßanalytischen Bestimmungen, daß Ammoniak besonders in verdünnter Lösung nicht mit Schwefelsäure zu titrieren ist, sondern mit Salzsäure, weil die merkliche Hydrolyse des Ammoniumsulfats bei der Titration ein frühes Eintreten der Säurereaktion bedingt. Wir prüften wiederholt in Parallelversuchen die Titration einer und derselben Flüssigkeit mit beiden Säuren, fanden aber keinen merklichen Unterschied, so daß wir weiterhin mit der uns zur Verfügung stehenden Schwefelsäurelösung arbeiteten.

Tabelle VII.

	U+ g	Verdünnt auf	Trockenurease	Temperatur	Nach 1 Std.		Nach 2 Std.		Nach 3 Std.		Nach 24 Std.	
					U+ g	Proz.	U+ g	Proz.	U+ g	Proz.	U+ g	proz.
A	0,10876	50	1 g	30—35°	0,048	44,1	0,0765	69,9	0,1035	95,0	0,105	96,5
B	0,10876	50	1 g	30—35	0,045	41,3	0,072	65,8	0,1035	95,0	0,105	96,5
C	0,10876	50	1 g	30—35	0,048	44,1	0,070	64,4	0,102	93,6	0,1075	95,0
D	0,10876	50	1 g	40—45	0,0525	48,2	0,075	68,8	0,105	96,5	0,105	96,5
E	0,10876	50	1 g	40—45	0,060	55,1	0,0795	72,9	0,105	96,5	0,1035	95,0
F	0,10876	50	1 g	40—45	0,0615	56,5	0,082	75,7	0,105	96,5	0,105	96,5
G	0,05438	50	1 g	50—55	0,0525	96,5	0,0525	96,5	0,051	93,7	0,0525	96,5
H	0,05438	50	1 g	50—55	0,051	93,8	0,0525	96,5	0,0525	96,5	0,0525	96,5
J	0,05438	50	1 g	50—55	0,049	91,0	0,0525	96,5	0,0525	96,5	0,051	93,7
L	0,10876	50	1 g	50—55	0,087	79,5	0,102	93,6	0,105	96,5	0,105	96,5
M	0,10876	50	1 g	50—55	0,087	79,5	0,1035	95,0	0,105	96,5	0,105	96,5
N	0,05438	50	1 g	60—65	0,045	82,2	0,048	87,7	0,048	87,7	0,0495	90,8
O	0,05438	50	1 g	60—65	0,048	87,7	0,0465	85,2	0,048	87,7	0,0465	85,2
P	0,05438	50	1 g	60—65	0,045	82,2	0,048	87,7	0,0465	85,2	0,048	87,7
Q	0,10876	50	1 g	60—65	0,081	75,0	0,093	85,4	0,0915	83,9	0,09	82,6
R	0,10876	50	1 g	60—65	0,084	76,6	0,093	85,4	0,093	85,4	0,09	82,6
S	0,10876	50	1 g	70—75	0,033	30,1	0,0315	28,9	0,03	27,5	0,03	27,5
T	0,10876	50	1 g	70—75	0,033	30,1	0,0315	28,9	0,03	27,5	0,028	25,9

In der Zeit zwischen 3 und 24 Stunden wurden die Proben bei Thermostattemperatur von 37° gelassen.

c) Temperaturoptimum.

Aus dieser Tabelle VII, deren Versuche bei verschiedenen Temperaturen ausgeführt worden sind, geht hervor, daß das Optimum der Temperatur bei der Vergärung mittels Urease bei 50° liegt, was mit den Ergebnissen anderer Untersucher übereinstimmt. Welches Verhältnis zwischen Temperatur und Vergärungsgeschwindigkeit besteht, läßt sich nicht genau aus der Tabelle entnehmen. Leicht ersichtlich ist, daß bis 50° mit dem Ansteigen der Temperatur auch die Vergärung rascher vor sich geht. Über die genaue Untersuchung des Verlaufes der Reaktion und deren Beeinflussung durch erhöhte Temperatur werden wir später an der Hand weiterer Versuche berichten.

---

[1]) *Naumann* und *Rücker*, Journ. f. path. Chem. **74**, 249.

Bei 60° z. B. ist schon diese schädigende Wirkung der Temperatur aus der Tabelle ersichtlich, besonders aber bei 70°, wo die Vergärung nur bis auf etwa 30 Proz. des Substrats erfolgte.

Aus der Tabelle ist auch zu ersehen, daß, entsprechend unseren früheren Versuchen, bei *verdünnten Proben* die Spaltung viel weiter geht und das Gleichgewicht der Reaktion infolgedessen zugunsten der Ammoniumcarbonatbildung verschoben wird.

d) Korrektur.

Die Korrektur, die wir auf Grund unserer Bestimmungen vorschlagen möchten, beträgt: **3,5 Proz.**[1]).

Diese Korrektur unterscheidet sich nur wenig von dem schon erwähnten Vergärungsfehler von *Bahlmann* (l. c.), welcher mit dem *Folin*schen Verfahren nach der Vergärung stets 4 Proz. Harnstoff *weniger*, als er vorgelegt hatte, wiedergefunden hat.

B. Indirekte Harnstoffbestimmung.

Die im vorstehenden geschilderte Methode reicht vollständig zur klinischen Untersuchung aus und erreicht eine Genauigkeit, die von den gewöhnlichen Methoden nicht übertroffen wird[2]). Doch verhehlen wir uns nicht, daß besonders, wenn man sich nicht mit der Methodik vertraut gemacht hat, Fehler unvermeidlich sind. Wir arbeiteten daher eine andere Methode aus, welche nach Art der alten *Krüger*schen Methode für die Ammoniakbestimmung vor sich geht, aber durch Veränderungen in der Apparatur und durch Einschaltung eines Kontrollapparates zur Beurteilung des Beginns und der absolut sicheren Beendigung der Reaktion modifiziert erscheint. Bei anderen Methoden zur Ammoniakbestimmung ist die Dauer der Reaktion als konstant hingestellt worden. Es ist daher nur selbstverständlich, warum die Autoren zu so verschiedenen Resultaten gelangt sind. Der variierende, von den verschiedenen Wasserstrahlpumpen gelieferte *Druck*, der verschiedene *Harnstoff-* bzw. *Ammoniakgehalt* der zu untersuchenden Flüssigkeit und andere Faktoren, die hier nicht berücksichtigt werden können, wirken auf die Dauer der Reaktion derart ein, daß, wenn man zur Vornahme der Destillation immer die gleiche Zeit verwendet, im allgemeinen ein verläßliches richtiges Resultat nicht erreicht werden kann, es wäre denn, daß in diesem Zeitpunkt zufällig die Überführung des Ammoniaks beendet wäre.

---

[1]) Wir bemerken, daß bei den schon angegebenen Faktoren für die Berechnungen des Harnstoffs und des Harnstoff-N die Korrektur schon berücksichtigt worden ist.

[2]) Wie aus unserer demnächst erscheinenden Arbeit über Stoffwechsel während der Schwangerschaft zu ersehen sein wird.

Um die Beendigung der Ammoniakbildung verläßlich feststellen zu können, haben wir schon vor einem Jahre[1]) einen Apparat vorgeschlagen, den wir bei unseren Untersuchungen systematisch verwendeten. Im folgenden geben wir eine Beschreibung des von uns gegenwärtig verwendeten *Destillationskontrollapparates*, der in einigen Details modifiziert worden ist, um die nach unseren Erfahrungen leicht eintretenden Fehler zu vermeiden.

Der in der Abbildung dargestellte Destillationskontrollapparat *A* besteht aus einer U-förmig gebogenen Röhre, deren kürzerer Schenkel *b* birnenförmig erweitert und mit dem längeren Schenkel bei *f* verbunden ist.

Ein mit einem Hahn *d* versehener Trichter (ein kleiner Scheidetrichter eignet sich besonders gut, da derselbe verschließbar ist und dadurch die Neutralisation der in demselben befindlichen Säurelösung durch das in der Luft vorhandene Ammoniak verhindert werden kann) *c* wird durch einen Schlauch mit dem längeren Schenkel *a* verbunden. In dem birnenförmigen Schenkel *b* wird das schräg abgeschnittene Ende der Röhre *h* so weit hineingeschoben, daß die Spitze derselben in die Flüssigkeit eintaucht.

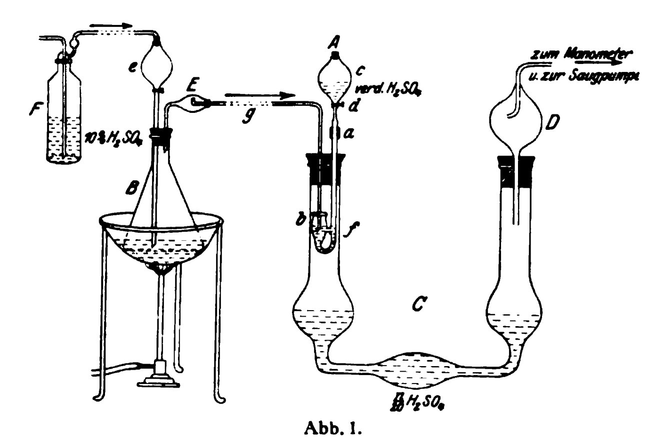


Abb. 1.

Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, haben wir auch einige kleine Änderungen in der Versuchsanordnung des Destillationsapparates nach *Krüger* und *Reich* angebracht. Da wir eine Saugpumpe verwendeten, brachten wir mit dem Trichter *e* eine mit verdünnter Säure beschickte Gaswaschflasche *F* in Verbindung, um nur absolut ammoniakfreie Luft in den Apparat zu bringen. Die mit dem Trichter *e* verbundene Röhre wurde in die Flüssigkeit getaucht, damit die Luft durch dieselbe ihren Weg nimmt.

Um ein Überfließen auch von minimalen Spuren von Alkali in die *Peligot*sche Röhre zu verhindern, wurde noch ein ähnlicher Ansatz *E* wie bei *D* zur Verbindung mit dem Destillationskontrollapparat (D. K. A.) verwendet. Wir ermitteln etwa im Harn zuerst das darin enthaltene präformierte Ammoniak und hernach den Harnstoffgehalt nach vollzogener Vergärung.

[1]) *Revoltella*, diese Zeitschr. **134**, 349, 1922.

a) Bestimmung des präformierten Ammoniaks.

In den Kolben *B* brachten wir 2 ccm des zu untersuchenden frisch entleerten filtrierten Harns, welchen wir bis auf 30 bis 40 ccm verdünnten. In der Peligotröhre *C* wurde eine solche Menge n/20 Schwefelsäure vorgelegt, daß sie einen sicheren Überschuß über das zu erwartende Ammoniak ergab. Für gewöhnlichen Harn genügen sicher 15 ccm, die natürlich verdünnt werden mußten, so daß der untere Teil der Röhre gefüllt war. Ein kleiner Bruchteil dieser Säure wurde in den Trichter *c* gegossen, auf das 25- bis 30fache verdünnt und durch Zusatz von Methylorange deutlich rot gefärbt. Nach Herstellung der nötigen Verbindungen, wie sie die Abbildung angibt, gossen wir in den Kolben *B* durch den Trichter *e* 5 ccm einer 10proz. Natroncarbonatlösung, und nach Verbindung mit der Gaswaschflasche *F* erhitzten wir denselben im Wasserbade auf 40 bis 45°. Nun wurde langsam und vorsichtig die Pumpe in Gang gesetzt und ein Druck von 35 bis 40 cm Quecksilber erzeugt. Um den Beginn der Destillation festzustellen, ließen wir aus dem Trichter *c* ein wenig Säure in den D. K. A. fließen und beobachteten, ob eine Verfärbung (gelbe) des Indikators stattgefunden hatte, was nach 2 bis 4 Minuten geschah.

Gewöhnlich nimmt die Dauer der Destillation ungefähr 10 Minuten in Anspruch. Auch die Beendigung der Destillation wurde mit dem D. K. A. festgestellt. Wir betrachteten eine Destillation als vollständig beendet, wenn die in den D. K. A. gegebenen verdünnten Säuremengen (1 ccm entspricht etwa 0,000028 Ammoniak!) nach 5 Minuten keine Änderung der Farbe aufgewiesen hatte.

Die Reaktion konnte auch beschleunigt werden, indem wir durch den Trichter *e* tropfenweise 10 ccm 90proz. Alkohols einfließen ließen. Sobald die Destillation vollendet war, verschlossen wir die Verbindung zwischen der Peligotröhre und Kolben *B* mittels eines Quetschhahnes, ließen vorsichtig (Vakuum!) die im Trichter *c* enthaltene Säure abfließen und spülten mit destilliertem Wasser den ganzen D. K. A. aus, um ihn von Säurespuren zu befreien. Sodann wurde die Verbindung (nicht die Wasserstrahlpumpe selbst!) mit der Pumpe verschlossen und sehr vorsichtig Luft einströmen gelassen. Nachher konnte man die Titration in der *Peligot*schen Röhre durchführen. Ist aber die Flüssigkeitsmenge in der Peligotröhre groß, so empfiehlt es sich, die Säure in einen entsprechenden Rundkolben zu gießen und die Peligotröhre mit destilliertem Wasser nachzuspülen, um die Titration angenehmer und sicherer mit n/20 Lauge durchführen zu können[1]).

Die Differenz zwischen der in Kubikzentimetern ausgedrückten Menge der vorgelegten Säure und jener der zur Rücktitration ver-

[1]) Ein weiterer Zusatz vom Indikator ist überflüssig, da die im D. K. A. vorhandene Menge zur Titration ausreicht.

wendeten n/20 Lauge ergibt die Ammoniakmenge, welche in den 2 ccm Harn enthalten war. Jeder Kubikzentimeter entspricht 0,00085 Ammoniak. Die Berechnung auf 100 ccm Harn erfolgt, indem die erhaltene Zahl mit 0,0425 multipliziert wird. Der entsprechende Ammoniakstickstoff wird gefunden, indem dieselbe Zahl mit 0,035 multipliziert wird.

b) Harnstoffbestimmung.

2 ccm desselben filtrierten Harns wurden in den Kolben *B* auf 30 bis 40 ccm mit destilliertem Wasser verdünnt. In die Peligotröhre wurde auch bei dieser Bestimmung die erforderliche Menge n/20 Schwefelsäure eingebracht. Ein Bruchteil dieser Säure wurde in den Trichter *c* gebracht, wie oben auf das 25- bis 30fache verdünnt und mit Methylorange gefärbt. Nach Verbindung der Peligotröhre mit der Wasserstrahlpumpe und dem Kolben *B* gaben wir in die zu vergärende Harnlösung — je nach dem Titer des Ferments (s. ersten Teil dieser Arbeit) — eine bestimmte Menge Trockenurease und (um das Schäumen zu verhindern) ein Stückchen Paraffin hinzu, verschlossen den Kolben und stellten ihn nach leichtem Schütteln ins Wasserbad bei einer Temperatur von 40 bis 45^0 (Mikrobrenner empfohlen!). Der Trichter *e* wurde mit der Gaswaschflasche *F* verbunden, die Saugpumpe in Betrieb gesetzt und ein sehr langsamer Luftstrom (jeder Schaum ist zu vermeiden) durch die zu vergärende Flüssigkeit durchgeleitet.

Gewöhnlich zeigte auch schon nach 3 bis 5 Minuten die Säurelösung des Kontrollapparates bei reinen Harnstofflösungen oder bei von Ammoniak befreiten Harnen einen Umschlag der roten Farbe in die gelbe, was uns ersehen ließ, daß das Ferment seine Wirkung auf den Harnstoff begonnen hatte.

Bei einem Ferment, welches denselben Titer zeigte, wie das der Tabelle I, konnten wir mit Sicherheit annehmen, daß die Vergärung nach einer Stunde vollständig beendet war, da ja dieselbe Fermentmenge bei gleicher Temperatur eine Substratmenge gleich 0,056 zu spalten imstande war, während in 2 ccm Harn sehr selten mehr als 0,03 g (1,5 Proz.) enthalten sind.

Stand uns aber eine nicht besonders wirksame Urease zur Verfügung, oder wollten wir mit der größten Vorsicht arbeiten, so nahmen wir, um die Vergärung nach einer Stunde sicher zu beenden, eine entsprechende größere Menge Trockenurease.

War die Vergärung beendet, so gingen wir (ein großer Teil des präformierten und gebildeten Ammoniaks ist schon durch den langsamen Luftstrom in die Säure übergeleitet) zur Destillation des gebildeten Ammoniaks über. Zu diesem Zwecke schlossen wir den Trichter *e* mit dem Hahn, lösten die Verbindung mit der Gaswasch-

flasche *F* und gaben, wie bei der Ammoniakbestimmung, in den Trichter *e* 10 ccm einer 10proz. Natroncarbonatlösung und 10 bis 20 ccm Alkohol hinzu. Nach Wiederherstellung der Verbindung mit der Gaswaschflasche ließen wir den Inhalt des Trichters vorsichtig tropfenweise in den Kolben fließen. Um die Destillation zu beschleunigen, wurde der durch die Flüssigkeit geleitete Luftstrom verstärkt, indem in unserem Quecksilbermanometer der Druck auf 20 cm Quecksilbersäule erniedrigt wurde. Die erforderliche Zeit variiert je nach der Ammoniakmenge zwischen 2 oder 3 Stunden. Ist der D. K. A. einmal eingestellt, so erfordert er keine besondere weitere Überwachung, nur muß man sich zeitweilig mittels des Kontrollapparates vom Fortgang der Reaktion überzeugen. Das Resultat der Titration, die mit n/20 Lauge wie bei der Ammoniakbestimmung durchgeführt wird, entspricht der Menge des *präformierten* plus des aus dem Harnstoff *gebildeten* Ammoniaks. Da wir die Menge des präformierten Ammoniaks bereits bestimmt haben, so kann man mit Leichtigkeit die dem Harnstoff entsprechende Ammoniakmenge errechnen. Diese Zahl, multipliziert mit dem Faktor 0,075, ergibt in Grammen die in 100 ccm Harn enthaltene Harnstoffmenge; multipliziert mit 0,035 die entsprechende Harnstoffstickstoffmenge.

Daß bei dieser Methode *keine weitere Korrektur* erforderlich ist, *da die Vergärung bis zu Ende geht*, ergibt auch Tabelle VIII, in welcher die Resultate einiger Untersuchungen eingetragen sind.

Tabelle VIII.

	U+ g (1)	Verdünnung	Trockenurease	Temperatur	Zeit Std.	Vorgelegte n/10 H_2SO_4	Zurücktitrierte n/10 NaOH	Gefund. U+ (2)		Differenz (1)—(2)	
								g	Proz.	g	Proz.
A	0,1062	50	1 g	45—50°	7	40	4,7	0,1059	99,7	0,0003	—0,3
B	0,1062	50	2 g	45—50	6	40	4,8	0,1056	99,3	0,0006	—0,7
C	0,053	50	1 g	45—50	5	20	2,3	0,0531	100,0	—	—
D	0,04782	50	1 g	37°	10	20	4,2	0,0474	99,1	0,00042	—0,9
E	0,04782	50	1 g	50	6	20	4,1	0,0477	99,7	0,00012	—0,3
F	0,10876	50	1 g	45—50°	7	50	14,2	0,1074	98,8	0,00136	—1,2
G	0,1631	50	1 g	50—55	8	60	5,8	0,1626	99,5	0,0005	—0,5
H	0,10876	50	1 g	45—50	$4^1/_2$	40	4,0	0,108	99,3	0,00076	—0,7
J	0,10876	50	1 g	45—50	4	40	4,1	0,1077	99,1	0,00106	—0,9

Es empfiehlt sich, das Ferment, wie wir es früher angegeben haben, vorher auszuwerten. Denn erst, wenn wir sicher sind, daß die Vergärung vollständig beendet ist, können wir die Destillation des gebildeten Ammoniaks vornehmen! Die meisten auf demselben Prinzip beruhenden Methoden, z. B. die von *A. R. Rose* und *K. R. Colemann* (l. c.), von *Donald D. van Slyke*[1]) usw. sehen davon ab und bestimmen empirisch eine be-

[1]) *Donald D. van Slyke*, Journ. of biol. Chem. **19**, 211, 1914.

stimmte Zeit, die gewöhnlich sehr klein bemessen ist (*A. R. Rose* und *Colemann* fanden, daß für die Überführung des gebildeten Ammoniaks nach dem *Folin*schen Verfahren nur 35 Minuten nötig sind und nicht 6 Stunden, wie es *Folin* angibt!).

Die verschiedene Wirksamkeit der Fermente, die aus verschiedenartigen Sojabohnen hergestellt worden sind, ist schon seit langem bekannt; was daher für ein gutes Ferment gilt, kann nicht für ein anderes schwächeres gelten! Wenn wir uns außerdem den in weiteren Grenzen verschiedenen Harnstoffgehalt des Harns vor Augen halten, weiter die Schwankungen der Temperatur, den verschiedenen Zustand des Harns, den verschiedenen Gehalt an Salzen, und bei pathologischen Harnen auch an Traubenzucker (welcher, wie wir sehen werden, hemmend auf die Aktion des Ferments wirkt), können wir überzeugt sein, daß die ohne Berücksichtigung aller dieser Umstände ausgeführten Bestimmungen nicht immer zu genauen und befriedigenden übereinstimmenden Resultaten führen konnten.

Wir möchten nur noch in Kürze auf den Verlauf der Vergärung bei obigem Verfahren hinweisen. Bei den früheren Versuchen hatten wir immer von einer *Gleichgewichtsreaktion* gesprochen und hatten auch die Korrekturen angegeben, welche, entsprechend dem Typus der Reaktion, erforderlich sind, um genaue Werte zu bekommen. Nun ist es bei diesem letzten Verfahren mittels D. K. A. interessant, daß wir, wie wir schon vermutet hatten, das Gleichgewicht verschieben können. Es ist Tatsache, daß, wenn wir die Spaltungsprodukte (Ammoniak und Kohlensäure) aus der zu vergärenden Flüssigkeit nach ihrer Bildung entfernen, auch ihre schädigende Wirkung auf den weiteren Verlauf der Vergärung fortfällt und die Wirkung des Enzyms sich ungehindert äußern kann. Danach müßte das Ferment eine vollständige 100proz. Spaltung bewirken, was im allgemeinen, bis auf kleine unvermeidliche (höchstens 1proz.) Schwankungen, nach unserer Erfahrung auch tatsächlich zutrifft.

C. Einfluß normaler und pathologischer Bestandteile des Harns auf die Harnstoffspaltung.

a) Harnsäure.

Die Wirkung der Urease wird durch Harnsäure gar nicht beeinflußt. Wir machten den Versuch derart, daß, indem wir 0,07proz. Harnsäurelösung in Lithiumcarbonat herstellten und damit nach genauer Neutralisierung vier Proben mit steigendem Harnsäuregehalt ansetzten[1]).

---

[1]) Bei diesen wie bei allen folgenden Versuchen wurde immer unter denselben Umständen eine Probe eingestellt, die wir als „Blindversuch" bezeichnen, und welche den Vergleich zwischen der normalen Bestimmung und den Bestimmungen mit den Stoffen, die zur Untersuchung herangezogen wurden, ermöglicht.

Tabelle IX.

	Harnsäure g	U+ g	Verdünnung	Trockenurease	Temperatur	Nach 1½ Stunden U+ g	Proz.	Nach 2½ Stunden U+ g	Proz.	Nach 24 Stunden U+ g	Proz.
A	Blindversuch	0,10876	50	1 g	45—50°	0,105	96,5	0,105	96,5	0,1035	95,0
B	0,007	0,10876	50	1 g	45—50	0,102	93,6	0,105	96,5	0,102	93,6
C	0,014	0,10876	50	1 g	45—50	0,1035	95,0	0,105	96,5	0,105	96,5
D	0,021	0,10876	50	1 g	45—50	0,102	93,6	0,105	96,5	0,1035	95,0
E	0,028	0,10876	50	1 g	45—50	0,1035	95,0	0,1035	95,0	0,1020	93,6

Wie aus der Tabelle IX ersichtlich ist, können wir also mit um so größerer Sicherheit unsere Bestimmung durchführen, als ja ein derartig großer Harnsäuregehalt (0,028 g in 5 ccm Harn = 0,56 Proz.) kaum vorkommt.

b) Eiweiß.

Schon *M. Falk*[1]) hat vor einiger Zeit die Beobachtung gemacht, daß Serum nicht nur nicht den Verlauf der Vergärung stört, sondern sogar beschleunigend auf die Spaltung des Harns einwirkt. Wir haben den Versuch bei unserem Verfahren wiederholt, indem wir Serumalbumin (als sehr leicht wasserlöslich) verwendeten und fünf Proben mit steigenden Serummengen ins Wasserbad einstellten.

Tabelle X gibt die Resultate der Versuche wieder.

Tabelle X.

	Serum ccm	U+ g	Verdünnung	Trockenurease	Temperatur	Nach ½ Stunde U+ g	Proz.	Nach 1 Stunde U+ g	Proz.	Nach 2 Stunden U+ g	Proz.
A	Blindversuch	0,10875	50	1 g	50°	0,0375	34,4	0,078	71,7	0,105	96,5
B	0,5	0,10875	50	1 g	50	0,0420	38,6	0,0945	86,9	0,1065	97,7?
C	1,0	0,10875	50	1 g	50	0,0420	38,6	0,096	88,3	0,1095?	—
D	1,5	0,10875	50	1 g	50	0,0450	41,4	0,1005	92,4	0,1125?	—
E	2,0	0,10875	50	1 g	50	0,0465	42,7	0,1035	95,0	0,1140?	—
F	2,5	0,10875	50	1 g	50	0,0490	45,5	0,108	99,3?	0,1140?	—

Aus der Tabelle X geht deutlich hervor, daß die Proben B und C usw., welche steigende Serumsmenge enthalten, größere Werte aufweisen als die Probe A, welche als Blindversuch kein Serum enthielt. Wir müssen aber dieses Ergebnis mit Vorsicht aufnehmen, da einerseits im Serum wohl eine sehr kleine, aber doch immerhin eine gewisse Menge Harnstoff enthalten ist, die natürlich von der Urease angegriffen und gespalten wurde, andererseits, was uns erfahrungsgemäß wichtiger erscheint, eine genaue Titration bei einer Eiweiß enthaltenden Flüssigkeit unmöglich durchzuführen ist.

---

[1]) *M. Falk*, diese Zeitschr. **59**, 298, 1914.

Bekanntlich gehört ja Eiweiß zu den sogenannten Puffersystemen, welche sowohl als Ampholyte als auch als Absorbentien H und OH festzuhalten vermögen[1]). Nun liegt es auf der Hand, daß, abgesehen von den Trübungen, die bei der Titration entstehen können, eine so genaue Titration wie beim Blindversuch kaum zu erwarten ist.

Sörensen spricht in solchen Fällen von einem Eiweißfehler[2]). Was die Schwierigkeiten des Umschlagpunktes anbelangt, so hat diesen Umstand schon *Marshall* beobachtet.

Die Ergebnisse der Titration nach 2 Stunden ergeben einen vollständigen Beweis unserer Ausführungen.

Daraus ergibt sich, daß alle Methoden, die eine Titration der vergorenen Flüssigkeit direkt vorschlagen, zu ungenaueren Resultaten führen müssen. Wir werden daher entweder den Harn mittels Hitzekoagulation enteiweißen oder besser das Verfahren mittels D. K. A. anwenden müssen.

Was die Methode der Enteiweißung anbelangt, möchten wir kurz bemerken, daß man von ihr keine ganz exakten Bestimmungen erwarten darf, weil ein Teil des Harnstoffs von dem geronnenen Eiweiß mitgerissen wird. Dieser Fehler kommt auch natürlich bei den gewöhnlichen Fällungsmethoden für die Reststickstoffbestimmungen im Serum in Betracht.

c) Aminosäuren.

Obwohl diese normalerweise im Harn nur in ganz minimalen Mengen enthalten sind und auch in pathologischen Zuständen die Menge derselben nicht in so erheblichem Maße ansteigt, daß eine Beeinträchtigung der Ureasewirkung zu befürchten wäre, haben wir doch versucht, ob und inwieweit wir die Ergebnisse von *Jacoby* und anderen[3]) über die Auxowirkung der Aminosäure bestätigen könnten.

Tabelle XI ergibt Übereinstimmung mit den Ergebnissen der genannten Forscher. Ob auch hier das amphotere elektrolytische Vermögen der Aminosäuren in Betracht kommt oder nicht, können wir an Hand unserer Versuche nicht entscheiden. Wir vermuten es aber.

P. Rona und *György* (l. c.) fanden im Gegenteil, daß keine fördernde Wirkung der Aminosäuren zu erkennen sei, wogegen *Jacoby*[4]) Widerspruch erhoben hat.

Tabelle XI.

	Glykokoll g	U+ g	Verdünnung	Trockenurease	Temperatur	Nach 1/2 Stunde		Nach 1 Stunde		Nach 3 Stunden	
						U+ g	Proz.	U+ g	Proz.	U+ g	Proz.
A	Blindversuch	0,10876	50	1 g	50—55°	0,0465	42,7	0,0840	77,3	0,1050	96,5
B	0,1	0,10876	50	1 g	50—55	0,0510	46,8	0,0915	84,1	0,1035	95,0
C	0,2	0,10876	50	1 g	50—55	0,0525	48,3	0,0945	86,9	0,1050	96,5
D	0,3	0,10876	50	1 g	50—55	0,0525	48,3	0,0960	88,3	0,1065	97,9?
E	0,4	0,10876	50	1 g	50—55	0,0555	51,0	0,1035	95,0	0,1080	99,3?

[1]) *Höber*, Physik. Chem. usw. 1, 120, 1922.
[2]) *Michaelis*, Wasserstoffionenkonzentration, S. 176, 1914.
[3]) *M. Jacoby*, diese Zeitschr. 74, 105.
[4]) *Derselbe*, ebendaselbst 14, 152, 1921.

d) Traubenzucker.

Wie aus der Tabelle XII ersichtlich ist, wird die Ureasewirkung wohl ein wenig verzögert, doch geht die Vergärung trotzdem vollständig zu Ende.

Tabelle XII.

	Traubenzucker g	U+ g	Verdünnung	Trockenurease	Temperatur	Nach 1 Stunde		Nach 3 Stunden		Nach 24 Stunden	
						U+ g	Proz.	U+ g	Proz.	U+ g	Proz.
A	Blindversuch	0,2409	50	1 g	50°	0,1050	43,5	0,2325	96,5	0,2340	97,0
B	0,15	0,2409	50	1 g	50	0,0870	36,0	0,2235	92,7	0,2325	96,5
C	0,30	0,2409	50	1 g	50	0,0755	31,3	0,2225	93,3	0,2295	94,8
D	0,45	0,2409	50	1 g	50	0,0870	36,0	0,2225	93,3	0,2319	96,4

Auch *Donald D. van Slyke* und *Gotthard Zacharias*[1]) fanden, daß Glucose unterhalb einer gewissen Konzentration verzögernd auf den Verlauf der Reaktion einwirkt, indem vielleicht die Geschwindigkeit der Anlagerung von Harnstoff an das Enzym verzögert wird.

e) Kochsalz.

Dieses Salz hat keinen wesentlichen Einfluß auf den Verlauf der Vergärung. Tabelle XIII zeigt, daß dieses auch der Fall ist, wenn es in beträchtlicher Konzentration vorhanden ist.

Tabelle XIII.

	NaCl g	U+ g	Verdünnung	Trockenurease	Temperatur	Nach $1^1/_2$ Stunden		Nach $2^1/_2$ Stunden		Nach 24 Stunden	
						U+ g	Proz.	U+ g	Proz.	U+ g	Proz.
A	Blindversuch	0,10876	50	1 g	45—50°	0,1020	93,6	0,105	96,5	0,1050	95,5
B	0,05	0,10876	50	1 g	45—50	0,1035	95,0	0,105	96,5	0,1035	95,0
C	0,10	0,10876	50	1 g	45—50	0,1020	93,6	0,105	96,5	0,1050	96,5
D	0,15	0,10876	50	1 g	45—50	0,1035	95,0	0,105	96,5	0,1050	96,5
E	0,20	0,10876	50	1 g	45—50	0,1035	95,0	0,105	96,5	0,1035	95,0
F	0,40	0,10876	50	1 g	45—50	0,1020	93,5	0,105	96,5	0,1035	95,0

f) Ammoniumcarbonat.

Schon früher hatten wir der Meinung Ausdruck gegeben, daß die Bildung von Ammoniumcarbonat starken Einfluß auf das Gleichgewicht der Reaktion ausübe. Die Versuche, die wir mit n/10 Ammoniumcarbonatlösung in verschiedenen Konzentrationen, wie Tabelle XIV zeigt, ausgeführt haben, bestätigen die Richtigkeit unserer Vermutung.

[1]) *Donald D. van Slyke* und *Zacharias*, Journ. of biol. Chem. **19**, 180, 1914.

Tabelle XIV.

	n/10 $(NH_4)_2CO_3$ ccm	U+ g	Verdünnung	Trockenurease	Temperatur	Nach 1½ Stunden U+ g	Nach 1½ Stunden Proz.	Nach 2½ Stunden U+ g	Nach 2½ Stunden Proz.	Nach 24 Stunden U+ g	Nach 24 Stunden Proz.
A	Blindvers.	0,10876	50	1 g	45—50°	0,0855	78,4	0,1035	95,0	0,1050	96,5
B	10	0,10876	50	1 g	45—50	0,0645	58,9	0,0990	90,8	0,1005	92,2
C	20	0,10876	50	1 g	45—50	0,0465	42,7	0,0660	60,1	0,0675	61,7
D	30	0,10876	50	1 g	45—50	0,0360	33,0	0,0375	34,4	0,0375	34,4
E	40	0,10876	50	1 g	45—50	0,0240	21,9	0,0270	25,0	0,0255	23,3

Betrachten wir die Endresultate der Tabelle XIV, so muß uns das Verhältnis zwischen der gespaltenen Substratmenge (Harnstoff) und dem zugesetzten Ammoniumcarbonat auffallen. Während nämlich der Blindversuch nach 24 Stunden eine Substratspaltung gleich 96,5 Proz. zeigt, weist der Versuch B, bei welchem 10 ccm n/10 Ammoniumcarbonatlösung zugesetzt worden waren, nach derselben Zeit nur eine Substratspaltung gleich 92,2 Proz., und der Versuch E mit viermal so viel Ammoniumcarbonat gar nur mehr 23,3 Proz. auf. *Je größer also die zugesetzte Ammoniumcarbonatmenge ist, desto kleiner wird die umgewandelte Harnstoffmenge und umgekehrt.*

Besonders anschaulich erhellt dies aus folgender Zusammenstellung, in welcher sich ergibt, daß die Summe:

$$\text{gebildetes } (NH_4)_2CO_3 + \text{zugesetztes } (NH_4)_2CO_3$$

konstant bleibt.

	Versuch:	B	C	D	E
Gebildetes n/10 NH_3	. . . ccm	34,0	22,5	12,5	8,5
Zugesetztes „ „	. . . „	10,0	20,0	30,0	40,0
	Summe:	44,0	42,5	42,5	48,5

Wir verweisen diesbezüglich auf die kürzlich erschienene Arbeit von *Sture Loevgren*[1]), in welcher die Kinetik der Reaktion ausführlich behandelt wird.

D. *Einfluß von Temperatur, H-Ionenkonzentration und Licht auf den Verlauf der Vergärung.*

a) Temperatur.

Wir hatten schon früher die Einwirkung der Temperatur auf den Verlauf der Vergärung geprüft und in Übereinstimmung mit fast allen Forschern gefunden, daß, während das Optimum bei 50° liegt, über

[1]) *Sture Loevgren*, Studien über Urease. Diese Zeitschr. **187**, 206, 1923.

diese Temperatur hinaus eine starke Schädigung der Wirksamkeit der Urease eintritt, so daß bei 70° nach unseren Versuchen, übereinstimmend mit denen von *Jacoby* und *Sugga* (l. c.), nur etwa 30 Proz. des Substrats gespalten wurden. Da wir aber die Versuche damals mit großen, über 10°, Temperaturschwankungen durchgeführt hatten, konnten wir nicht feststellen, ob das *van t' Hoff*sche Gesetz auch hier seine Anwendung finde. Wir wiederholten die Versuche mit Ausschaltung jener Temperaturschwankungen und geben die Ergebnisse in Tabelle XV wieder.

Tabelle XV.

	U+ g	Verdünnung	Trockenurease	Temperatur	Nach 1/2 Stunde		Nach 1 Stunde		Nach 3 Stunden	
					U+ g	Proz.	U+ g	Proz.	U+ g	Proz.
					a)					
A	0,10876	50	1 g	40°	0,0270	24,8	0,049	45,5	0,1050	96,5
B	0,10876	50	1 g	40	0,0285	26,2	0,051	46,8	0,1050	96,5
C	0,10876	50	1 g	40	0,0270	24,8	0,049	45,5	0,1065	97,9
					b)					
A	0,10876	50	1 g	50°	0,0465	42,7	0,0900	82,8	0,1050	96,5
B	0,10876	50	1 g	50	0,0490	45,5	0,0915	84,1	0,1065	97,9
C	0,10876	50	1 g	50	0'0480	44,7	0,0900	82,8	0,1050	95,5

Aus der Tabelle XV erhellt, daß das *van t' Hoff*sche Gesetz auch hier annähernd seine Gültigkeit behält.

Zum selben Ergebnis gelangte auch *Donald D. van Slyke*[1]) usw.

b) H-Ionenkonzentration.

Bekanntlich ist bei allen Fermenten die *H-Ionenkonzentration* von großer Wichtigkeit für den Verlauf der Substratspaltung. Auch für die Urease wurde das wiederholt geprüft und wurden allgemein übereinstimmende Werte gefunden. Was die Abhängigkeit von der Substratkonzentration anbelangt, wurde diese besonders eingehend von *Sture Loevgren* studiert (l. c.), welcher an Hand seiner Versuche feststellen konnte, daß die für die Enzymwirkung günstige p_H von der Harnstoffkonzentration in der Weise abhängig ist, daß mit steigender Substratmenge sich die Lage des p_H-Optimums nach der Säurenseite verschiebe.

Leider hatten wir schon unsere Arbeit abgeschlossen, als wir von der Arbeit dieses Verfassers Kenntnis erlangten, so daß wir uns ein eigenes Urteil über seine Schlußfolgerungen nicht bilden konnten. Auch

[1]) *Donald D. van Slyke*, Deutsch. med. Wochenschr. **40**, 1219, 1914.

diesbezüglich verweisen wir auf diese Arbeit (l. c.) und werden uns später erlauben, unsere Stellungnahme zu dieser Frage mitzuteilen. Wir möchten hier nur die Ergebnisse einer Versuchsreihe mitteilen, die wir ausgeführt haben, um im allgemeinen über die Wirkung der Anwesenheit von Säure oder Alkali auf den Verlauf der Vergärung durch Urease orientiert zu sein.

c) Licht.

Wir haben Versuche von *H. Wester*[1]) wiederholt, um den Einfluß, welchen die Sonnenstrahlen auf das Enzym ausüben, kennenzulernen, und tatsächlich fanden wir schon nach 12 Stunden Belichtung (zwischen 10 bis 16 Uhr im Juli) eine Abnahme der Enzymwirksamkeit. Wir können uns aber mit den Folgerungen des Verfassers nicht ohne weiteres einverstanden erklären, da eine ähnliche Abnahme der Enzymwirksamkeit auch bei Proben, die im *Dunkeln* aufbewahrt worden waren, bemerkt worden ist.

Neuerdings hat *Hellmut Deist*[2]) bei der 35. Tagung des Kongresses für innere Medizin in Wien (1923) vorgebracht, daß es ihm bei der Bestimmung der *Ambardschen Konstanten* mittels Urease [vgl. *Brugsch* und *Schittenhelm*[3])] nicht gelungen sei, Bestimmungen durchzuführen, die ein verläßliches Resultat ergaben. Er untersuchte einen Patienten, bei welchem die Blut- und Harnstoffbestimmungen mittels Urease *von verschiedenem Ursprung* durchgeführt wurden, und fand, daß die *Ambardsche Konstante* zwischen 0,0391 und 0,1075 lag; d. h. er fand gleichzeitig

Tabelle XVI.

U^+ = 0,2409 g; Verdünnung 50; Trockenurease 1 g; Temperatur 50°.

		ccm n/10 H_2SO_4							Blindversuch	ccm n/10 NaOH						
		5,0	4,0	3,0	2,0	1,5	1,0	0,5		0,5	1,0	1,5	2,0	3,0	4,0	5,0
Nach 2 Std.	U^+ g	0,012	0,033	0,039	0,063	0,081	0,0855	0,1411	0,1425	0,141	0,1395	0,129	0,120	0,117	0,039	0,015
	U^+ Proz.	4,9	13,6	16,2	26,1	33,6	35,5	58,5	59	58,5	57,7	53,4	49,7	48,5	16,2	6,2
Nach 24 Std.	U^+ g	0,019	0,099	0,120	0,1935	0,2175	0,2295	0,2295	0,2319	0,228	0,226	0,222	0,198	0,168	0,090	0,016
	U^+ Proz.	7,8	41,1	49,7	80,3	89,9	95,2	95,2	96,4	94,6	93,9	92,0	82,2	69,6	37,3	6,8

---

[1]) *H. Wester*, Pharm. Zentralhalle 57, 1916.

[2]) *Hellmut Deist*, Klin. Wochenschr. 20, 1923.

[3]) *Brugsch* u. *Schittenhelm*, Lehrbuch klinischer Diagnostik und Untersuchungsmethodik, 5. Aufl., S. 669, 1921.

bei einem und demselben Patienten subnormale und übernormale Werte. Wir zweifeln nicht an der Richtigkeit letzterer Ergebnisse, denn unseres Erachtens sind sie logisch durch die bisherige Methodik begründet, aber wir sind sehr weit entfernt, mit obigem Autor zu schließen, daß die Ureasemethode an sich unbrauchbar sei! Wir verfügen diesbezüglich über eine zweijährige Erfahrung und haben die Überzeugung gewonnen, daß man sich nicht gegen die *Methode* als solche, sondern nur gegen ihre bisherige *Anwendungsart* wenden soll.

Die Ureasemethode für die Harnstoffbestimmungen dürfte, richtig ausgeführt, die praktischste, die billigste und wohl ja auch die genaueste Methode sein, die uns heutzutage zur Verfügung steht. Aber sie verlangt eine ständige Kontrolle und Übung. Der Vergärungsgrad, der verschiedene Fermentgehalt der Sojabohnen, die Temperatur, die Harnstoffkonzentration, die Zeit, die Verdünnung usw. sind Faktoren, welche bei jeder Bestimmung in Betracht zu ziehen sind und deren Vernachlässigung sicherlich zu falschen und widersprechenden Resultaten führen müßte.

Zusammenfassung.

Zur Ergänzung unserer früher veröffentlichten Arbeit über die Herstellung, Wirksamkeit und Eigenschaften des Ureasetrockenferments waren wir in der Lage, eine Reihe von Untersuchungen anzustellen, die es uns ermöglichten, Verbesserungen in der *Methodik der Herstellung des Ferments* vorzuschlagen, sowie auf einige *Fehler* und deren *Vermeidung* aufmerksam zu machen und außerdem die Berechnung der schon damals *bezüglich der vorigen Versuche* in Aussicht genommenen *Gleichgewichtskorrektur* vorzunehmen.

Weiter werden zur *Bestimmung des Harnstoffs* im Harn zwei Methoden vorgeschlagen: Die erste liefert mit den einfachsten Mitteln Resultate, welche (nach Vornahme der Gleichgewichtskorrektur von + 3,5 Proz.) der gesamten, in 100 ccm Harn enthaltenen Harnstoffmenge entsprechen. Durch die Auswertung der Trockenurease ist man bei dieser Methode imstande, den *Verlauf*, *die Dauer* und *Vollständigkeit* der Reaktion in einfacher Weise zu *kontrollieren*.

Die zweite Methode eignet sich zur Bestimmung des Harnstoffs in jeder Körperflüssigkeit und ermöglicht zuverlässige und genaue Werte, die einer *weiteren Korrektur nicht bedürfen*. Bei der Verwendung des mit unserem Kontrollapparat versehenen und von uns verbesserten *Destillationsapparates* sind Ammoniakverluste ausgeschlossen, und die Destillation geht bis zum Ende. Andererseits wird der Zeitpunkt

der Beendigung der Vergärung auf Grund der Auswertung des Ferments festgestellt.

Sodann werden die Ergebnisse von Untersuchungen über die Einwirkung von verschiedenen, besonders in pathologischen Harnen in beträchtlichen Mengen vorkommenden Stoffen (*Harnsäure*, *Eiweiß*, *Aminosäure*, *Ammoniumcarbonat*, *Traubenzucker* usw.) auf die Vergärung mitgeteilt.

Zum Schluß wird an der Hand von Untersuchungen gezeigt, daß das *van t' Hoff*sche *Gesetz* auch bei dieser Vergärungsform Anwendung findet, und festgestellt, welchen Einfluß die H-Ionenkonzentration auf ihren Verlauf ausübt.

Zur Frage der Acetonämie, insbesondere bei der Avitaminose.

Von

Marcel Händel.

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 13. November 1923.)

Die Avitaminose zeigt nach mehreren in unserem Laboratorium durchgeführten Untersuchungen (*Bickel*, *Collazo*, *Rubino* und *Collazo*, *Asada*) Beziehungen einerseits zum Stoffwechsel im „echten" Hunger, andererseits zu der diabetischen Stoffwechselstörung. Mit dem „echten" Hunger hat die Avitaminose die Zersetzung der Körpersubstanz gemein (Entleerung der Glykogen- und Fettdepots). Es kommt bei der Avitaminose allerdings noch der Abbau der aufgenommenen Nahrungsstoffe hinzu. Avitaminose und Diabetes mellitus zeigen folgende Analogien (*Bickel* und *Collazo*): 1. Die Hyperglykämie, 2. die Glykogenarmut, 3. die ungünstige Beeinflussung des Allgemeinzustandes durch gesteigerte Nahrungszufuhr. Auffallend ist, daß man weder im Harn der avitaminösen Tiere Acetonkörper gefunden hatte, noch bei der Untersuchung der Blutalkaleszenz eine Acidosis feststellen konnte (*Collazo*). Es wäre also das Fehlen einer irgend beträchtlicheren Acidosis, die sich durch Harnuntersuchung feststellen ließe, bei der Avitaminose im Gegensatz zum „echten" Hunger und zum Diabetes als ein wichtiger, vielleicht wesentlicher Unterschied zwischen der Avitaminose und den beiden anderen genannten Zuständen zu bezeichnen.

Über den Mechanismus des Zustandekommens der Acetonurie sind wir zum großen Teil orientiert. Das größte Verdienst gebührt in dieser Richtung *Knoop*, der durch seine Lehre von der β-Oxydation den Ursprung der Acetonkörper und die einzelnen Etappen ihrer Entstehung aufgeklärt hatte. Wir wissen, daß die Acetonkörper aus den Fettsäuren, und zwar auf dem Wege Buttersäure, β-Oxybuttersäure, Acetessigsäure, Aceton entstehen. Wir wissen weiter, daß die Acetonkörper im Harn dann auftreten, wenn der Körper entweder Kohlehydrate nicht erhält (echter Hunger, einseitige Fetternährung), oder aber die Fähigkeit nicht besitzt, die zugeführten Kohlehydrate ordnungs-

mäßig zu verbrennen (verschiedene Formen des Diabetes). Was wir noch nicht übersehen, das ist erstens, ob auch normalerweise der Fettabbau über Acetonkörper verläuft bzw. in dem Maße, wie bei den genannten pathologischen Zuständen vor sich geht, und vor allem zweitens, wie die Zuckerverbrennung mit dem Entstehen der Acetonurie zusammenhängt. Wir wissen nichts Näheres darüber, wie es kommt, daß beim Fehlen der Kohlehydrate aus den Fettsäuren Acetonkörper entstehen und ausgeschieden werden und beim Zusatz der Kohlehydrate wieder verschwinden.

Ich habe nun, um die tatsächlichen Verhältnisse bei der Acetonkörpervermehrung bzw. -bildung im Körper sicher und genau feststellen zu können, die Untersuchungen auf Acetonkörper im Blute durchgeführt. Wir gingen dabei von der Voraussetzung aus, daß bei geringgradiger Acetonkörpervermehrung es zu keiner Acetonurie zu kommen braucht. Die Blutuntersuchungen haben wir mittels einer eigenen Mikromethode ausgeführt, deren Beschreibung wir im experimentellen Teil der Arbeit folgen lassen. Wir haben das Blut gesunder Menschen, Hunde, Kaninchen und das Rinderblut untersucht. Weiter haben wir Bestimmungen bei hungernden Hunden, beim Pankreas- und Phlorrhidzindiabetes des Hundes, bei gleichzeitiger Kombination von Hunger und Phlorrhidzin und vor allem bei avitaminösen Hunden ausgeführt. Wir kommen zu unseren Resultaten bei der Untersuchung der avitaminösen Tiere: Ein durch 11 Monate avitaminös ernährter Hund, der an schwerer Xerosis conjunctivae et corneae und Keratomalacie litt, hatte durchaus normale Acetonkörpermengen im Blute. Erst unmittelbar vor dem Tode, nachdem er infolge einer schweren Magen-Darmstörung gehungert hatte, konnten wir eine Acetonkörpervermehrung feststellen. Die letztere war wohl auf das Hinzukommen des „echten“ Hungers zur Avitaminose zurückzuführen. Ein zweiter Hund, der 5 Wochen vitaminfrei ernährt worden war, hatte ebenfalls normale Werte — da sich diese Werte nach einigen Tagen vitaminhaltiger Nahrung nur unwesentlich änderten, konnten sie keine Abweichung von der Norm bedeuten. Im Gegensatz dazu fanden wir ausgesprochene, wenn auch nicht so mächtige Acetonkörpervermehrung als beim Pankreasdiabetes bei bloß einige Tage hungernden Hunden.

Es besteht also bei der Avitaminose sicher keine Acidosis. Wie läßt sich das aber erklären? Man findet ja auch bei der Avitaminose Störungen des Kohlehydratstoffwechsels (Hyperglykämie), die vielleicht ebenso wie im Hunger, einseitiger Fetternährung und im Diabetes den ketogenen Fettabbau herbeiführen müßten. Es besteht aber doch in dieser Hinsicht ein wesentlicher Unterschied zwischen Avitaminose und den anderen Zuständen. Beim Hunger verbrennen die Kohlehydrate nicht, weil sie nicht zugeführt werden und die Vorräte des Körpers

gleich im Anfang verbraucht wurden — beim Diabetes, weil er Kohlehydrate zirkulieren läßt, ohne sie angreifen zu können. Im Diabetes finden sich zwei Momente zusammen: Das Unvermögen, Kohlehydrate als Glykogen zu speichern, und die Unfähigkeit, die zirkulierenden zu verbrennen. In der Avitaminose findet sich nur das erste. Das Glykogen kann nicht oder kann nicht vollkommen gespeichert werden — daher die Hyperglykämie —, das freigewordene oder das überhaupt nicht aufgespeicherte Zuckermolekül kann aber schließlich verbrannt werden, wenn auch die Körperzellen den Zucker verlangsamt aufnehmen (*Bickel* und *Collazo*). Es ist die Avitaminose „Selbstzersetzung der Körpersubstanz + Nahrungsverbrennung ohne hinreichende Nahrungsassimilation". Es entstehen in der Avitaminose bei der Zuckerverbrennung toxische Produkte (*Bickel* und *Collazo*) — es wird aber die Glukose letzten Endes doch verbrannt, und diese Zuckerverbrennung, die verlangsamt vor sich geht und bei der toxische Nebenprodukte abfallen, genügt nach unserer Meinung, um den Fettabbau in normale Bahnen zu dirigieren und die übergroße Acetonkörperproduktion und damit die Acidosis zu verhüten. Diese bei der Avitaminose doch schließlich zur Verbrennung gelangenden Kohlehydrate spielen in diesem Falle dieselbe Rolle, wie eine Kohlehydratgabe beim hungernden Tiere oder die Insulinbehandlung beim Diabetes, die ja schließlich auch zu einer besseren Verbrennung der Kohlehydrate führt — alles Momente, die neben Fettsäuren Zucker zur Verbrennung bringen und damit antiketogen wirken.

Bei der Besprechung der übrigen Befunde können wir uns ganz kurz fassen. Zunächst findet man im Blute, wenn man es sofort nach der Entnahme untersucht, nur Spuren von präformiertem Aceton oder überhaupt kein freies Aceton. Der größere Teil des Acetons entsteht im allgemeinen erst bei der Oxydation aus der β-Oxybuttersäure. Als Normalwerte beim Menschen fanden wir etwa 2 bis 4 mg Aceton aus Acetessigsäure und etwa 3 bis 5 mg aus β-Oxybuttersäure, beim Kaninchen etwas weniger, beim Hunde etwas mehr als beim Menschen. Die hochgradigste Acetonämie fanden wir bei Hunden fünf und mehr Tage nach der Pankreasexstirpation und bei mehrere Tage hungernden Hunden, die außerdem tägliche Phlorrhidzininjektionen bekommen haben. Geringere Acetonämie findet sich bei hungernden Tieren und bei Phlorrhidzin allein. Bei Acetonkörpervermehrungen im Blute kommt ganz allgemein der größte Anteil der β-Oxybuttersäure zu.

Experimenteller Teil.

Methodik. Wir bedienten uns bei den Bestimmungen einer Methode, die sich an die Mikromethoden nach dem Prinzip von *Bang* anlehnt. Wir haben unsere Methode zum Teil im Wiener Institut für

allgemeine und experimentelle Pathologie ausgearbeitet und hatten uns dabei der Beihilfe des Herrn Dozenten Dr. *Silberstein* zu erfreuen.

Zunächst mußte eine geeignete Extraktionsflüssigkeit gefunden werden. Als solche erwies sich eine heiß gesättigte wässerige Ammonsulfatlösung, die mit H_2SO_4 bis zum Gehalt von 1 Proz. versetzt worden war. Das zweite war die Extraktionsdauer. Das Aceton geht, wie zu erwarten war, schon nach relativ kurzer Zeit in die Flüssigkeit über, während die Acetessigsäure und vor allem die β-Oxybuttersäurewerte erst nach 8 Stunden konstant werden. Nachdem diese Vorfragen gelöst waren, versuchten wir die von *Embden* und *Schmitz* modifizierten Methoden von *Messinger-Huppert* bzw. *Shaffer* für die Mikroanalyse im Blute umzuarbeiten. Dazu war natürlich eine Apparatur nötig, welche es erlaubt, trotz der kleinen Blutmengen sichere Bestimmungen durchzuführen und Verluste bei der Destillation zu vermeiden. Bei der Mikrobestimmung des Acetons haben *Embden* und *Schmitz* die Redestillation dadurch überflüssig gemacht, daß sie ein zu weitgehendes Einengen der Ausgangsflüssigkeit vermieden. Bei der Mikromethode genügt schon eine Destillationsdauer von 2 Minuten; während dieser Zeit sinkt das Flüssigkeitsvolumen höchstens von 14 auf 10 ccm. Zahlreiche Kontrolluntersuchungen, auch mit Makromethoden, zeigten nun, daß unter den gewählten Versuchsbedingungen keine jodbindenden Substanzen außer Aceton übergehen. Bei der darauffolgenden Bestimmung der β-Oxybuttersäure durch Oxydation mit Chromschwefelsäure wurde das Volumen durch Zutropfen von Wasser konstant erhalten. Wie *Embden* mit Recht hervorhebt, kommt bei der Bestimmung der β-Oxybuttersäure nach *Shaffer* als Fehlerquelle das Vorhandensein von Zucker in der untersuchten Flüssigkeit in Betracht. Wir haben uns nun durch zahlreiche Versuche vergewissert, daß auch bei den bei stärksten Hyperglykämien vorkommenden Zuckerkonzentrationen in der Extraktionsflüssigkeit diese Fehlerquelle keine Rolle spielt, denn erst bei einem Zuckergehalt des Blutes von 1 Proz. erhält man eine Erhöhung des β-Oxybuttersäurewertes. Die letzte Schwierigkeit lag in der Feststellung der Bedingungen, unter denen die Jodoformreaktion bei den kleinen hier in Betracht kommenden Acetonmengen quantitativ abläuft. Versuche mit reinen Acetonlösungen ergaben, daß ein relativ großer Überschuß an NaOH und Jod nötig ist, um die Reaktion zu Ende zu führen. Auch die Reaktionszeit ist im Verhältnis zu den Makromethoden lang, da man erst nach 25 Minuten auf konstante Resultate rechnen kann. Es sei noch hervorgehoben, daß man die Vorlage nach Auffangen des Destillates 15 Sekunden lang schütteln muß.

Man kann auch leicht das präformierte Aceton separat bestimmen. Wir bedienen uns dabei des *Folin*schen Prinzips. Das freie Aceton wird mittels eines energischen Luftstromes ausgetrieben und entweder direkt in alkalischer Jodlösung aufgefangen und bestimmt, oder indirekt aus der Differenz zweier Proben, in denen man Totalaceton + β-Oxybuttersäure bzw. Acetessigsäure + β-Oxybuttersäure bestimmt, ermittelt (Differenzmethode). Die Bestimmung des freien Acetons scheint übrigens weniger Bedeutung zu haben; wir haben es im frischen Blut bloß in Spuren nachweisen können.

Um die kleinen Mengen Aceton ohne Verlust und bequem destillieren zu können, bedienen wir uns einer besonderen Apparatur, deren Beschreibung wir voranschicken möchten. Als Destillierkolben dient ein 100 ccm fassender Fraktionierkolben aus Jenaer Glas, dessen seitliches Rohr senkrecht nach

unten abbiegt und in seinem vertikalen Teile als Seele eines Liebigkühlers dient. Bei der β-Oxybuttersäurebestimmung setzt man einen kleinen (30 ccm) Tropfzylinder auf. Die verlängerte Kühlerseele führt durch die Bohrung eines Gummistopfens in die Vorlage und endet erst knapp über ihrem Boden. Die Vorlage ist ein zylindrisches, etwa 60 ccm fassendes Gefäß, das ein Seitenrohr trägt. Bei Bestimmung des präformierten Acetons dient letzteres zur Verbindung mit der Wasserstrahlpumpe, sonst wird es mit einem Wasser enthaltenden Sicherheitsrohr verschlossen.

Im einzelnen gestaltet sich die Bestimmung folgendermaßen: Nach der auf die übliche Weise vorgenommenen Hautreinigung wird das Blut rasch aus Fingerbeere oder Ohrläppchen in die vorbereiteten Filter eingesogen. Diese stellt man sich her aus dem gewöhnlichen Filtrierpapier durch Ausschneiden etwa $1\frac{1}{2}$ cm breiter, 16 cm langer Streifen, die vierfach zusammengefaltet werden. 24stündiges Einlegen in die Extraktionsflüssigkeit und mehrstündiges Waschen in häufig gewechseltem destillierten Wasser und nachfolgendes Trocknen der Filter ist ratsam. Man läßt in jedes Papierchen 200 bis 300 mg Blut einsaugen. Nach dem Wägen auf der Torsionswage übergießt man das Filter in einer Eprouvette mit 8 ccm der angesäuerten Ammonsulfatlösung, verschließt mit einem Stopfen und läßt mindestens 8 Stunden an einem kühlen Orte stehen; länger als 24 Stunden soll man mit der Bestimmung nicht warten. Nach dem Extrahieren wird die Acetonkörperlösung direkt in den Destillierkolben gebracht und mit 6 ccm der Extraktionsflüssigkeit nachgewaschen. Wenn sich Eiweißflocken vom Filter losgelöst haben, muß selbstredend durch ein kleines Filter filtriert und nachgewaschen werden. Nach Zusatz von etwas Talk verschließt man mit einem Gummistöpsel, schaltet die Vorlage, die 0,5 ccm 33proz. $NaOH$ und 1 ccm n/100 Jodlösung enthält, vor und erhitzt energisch mit freier Flamme, so daß innerhalb 2 Minuten 4 ccm überdestillieren. Nach beendigter Destillation verschließt man die Vorlage, schüttelt 15 Sekunden energisch, aber vorsichtig, damit nichts von der Flüssigkeit auf den Stopfen oder die seitliche Röhre kommt. Vor dem Titrieren bleibt die Vorlage durch 25 Minuten an einem dunklen Orte stehen. Für die β-Oxybuttersäurebestimmung schaltet man eine zweite Vorlage ein, in der sich wieder 0,5 ccm 33proz. $NaOH$ + 1 ccm n/100 Jodlösung befinden. In den Destillierkolben gibt man 5 ccm einer Chromschwefelsäurelösung, die 1,5 Proz. Kaliumbichromat und 15 Proz. H_2SO_4 enthält. Jetzt wird 5 Minuten lang destilliert, so daß 10 ccm übergehen. Dabei läßt man aus dem Tropfzylinder Wasser zutropfen, so daß das Volumen im Destillierkolben gleich bleibt. Der weitere Vorgang ist der gleiche wie bei der Acetonbestimmung. Nach 25 Minuten langem Stehen werden die Vorlagen durch Zusatz von je 2 bis 3 ccm 10proz. H_2SO_4 angesäuert und nach Zusatz von 1 bis 2 Tropfen Stärkelösung mit n/200 $Na_2S_2O_3$-Lösung

aus einer *Bang*schen Mikrobürette, die noch 0,01 abzulesen erlaubt, titriert. Selbstredend macht man immer zwei Parallelbestimmungen und daneben eine Blindanalyse (ohne Blut). Will man das präformierte Aceton neben Acetessigsäure und β-Oxybuttersäure mitbestimmen, so gestaltet sich der Vorgang folgendermaßen: Vor der Acetessigsäurebestimmung wird der Destillierkolben mit einem durchbohrten Gummistopfen verschlossen, der in seiner Bohrung ein bis auf den Boden des Kolbens reichendes, in seinem unteren Teil zu einer Kapillare ausgezogenes Glasröhrchen trägt. In die Vorlage kommt Jod und NaOH wie oben, das Seitenrohr der Vorlage wird mittels eines Vakuumschlauches mit einer Wasserstrahlpumpe verbunden; dann wird durch Aufdrehen der Pumpe 15 Minuten lang ein energischer Luftstrom durch das System geleitet, der das präformierte Aceton in die Vorlage mitreißt. Dann wird der Stopfen gewechselt, eine neue Vorlage eingeschaltet und weiter wie oben vorgegangen. Auf diese Weise läßt sich in einer Blutprobe die Bestimmung aller drei Acetonkörper durchführen; allerdings kann man sich für gewöhnliche Zwecke mit der Bestimmung des Totalacetons (das ist des präformierten Acetons und des Acetons aus Acetessigsäure) sowie der β-Oxybuttersäure begnügen. Hat man mehrere Blutproben zur Verfügung, so bestimmt man das freie Aceton besser so, daß man in einer Probe das Totalaceton und die β-Oxybuttersäure bestimmt, in der zweiten die Luftdurchleitung vorangehen läßt, ohne das freie Aceton aufzufangen, und aus der Differenz zwischen den zwei Proben das präformierte Aceton berechnet.

Die Berechnung gestaltet sich sehr einfach. 1 ccm der n/200 $Na_2S_2O_3$-Lösung entspricht 0,05 mg Aceton[1]), die Zahl der Kubikzentimeter der abgeflossenen n/200 $Na_2S_2O_3$-Lösung, von der bei der Leerbestimmung abgeflossenen subtrahiert und mit 0,05 multipliziert, gibt die Acetonmengen in Milligrammen in der betreffenden Blutprobe, die β-Oxybuttersäure berechnet man, indem man die Acetonmenge mit dem Faktor 3 multipliziert. Nachstehend ein praktisches Beispiel. Die Blutmenge sei 250 mg. Bei der Blindbestimmung wurden für Aceton 2,1 ccm, für β-Oxybuttersäure 2 ccm der $Na_2S_2O_3$-Lösung verbraucht. Die Titration ergab für Aceton 1,14, für β-Oxybuttersäure 1,88 ccm. Die Differenz für Aceton ist 0,16; daraus berechnet sich die Acetonmenge in Milligrammen: $0{,}16 \cdot 0{,}05 = 0{,}008$ mg, umgerechnet auf 100 g Blut ergibt sich also ein Acetongehalt von 3,2 mg. Die analoge Berechnung für β-Oxybuttersäure ergibt 2,4 mg Aceton, also 7,2 mg β-Oxybuttersäure pro 100 g Blut.

---

[1]) Diese Zahl ist selbstverständlich mit dem Umrechnungsfaktor der $Na_2S_2O_3$-Lösung zu multiplizieren, falls die Lösung nicht genau gestellt sein sollte.

Hund Nr. 1. 11 Monate avitaminös ernährt; schwere Xerosis conjunctivae et corneae, Keratomalacie.

Datum	Totalaceton mg	β-Oxybuttersäure pro (100 g Blut) mg
6. X. 1923	4,7	17,0
12. X.	3,9	16,3
19. X.	4,9	21,3
20. X.	Exitus; die letzten 3 Tage hatte der Hund gehungert.	
Hund Nr. 2. 5 Wochen avitaminöser Ernährung.		
17. X. 1923	3,7	14,0
22. X.	4,3	13,0
23. X.	3,1	13,9
Die letzten 4 Tage vitaminhaltige Nahrung.		
Hund Nr. 3. 5 Tage Hunger.		
	5	22,9
Hund Nr. 4. 5 Tage Hunger und 5 Phlorrhidzininjektionen.		
	6	26
Hund Nr. 5. 5 Tage nach der Pankreasexstirpation.		
	5,7	28,9
2 Tage später	6,3	32,0

Mikrobestimmungen in Acetonlösungen.

In 100 ccm Lösung direkt bestimmt mg	Mikromethode mg
20,5	19,6
10,0	8,7
5,2	4,9

Lösungen der β-Oxybuttersäure (Präparat von *Kahlbaum*)

In 100 ccm acidimetrisch bestimmt mg	Mikrobestimmung (in Aceton ausgedrückt) mg
33,0	12,0
15,0	4,7
20,0	6,7

Literatur.

A. Bickel, Klin. Wochenschr. 1922, Nr. 3; Deutsche med. Wochenschr. 1922, Nr. 29; *A. Bickel* und *Collazo*, ebendaselbst 1923, Nr. 45. — *Collazo*, Deutsche med. Wochenschr. 1923, Nr. 25, diese Zeitschr. **134**, 1922; **136**, 1923; **140**, 1923 u. *Gohse*, ebendaselbst **139**, 1923. — *Rubino* und *Collazo*, ebendaselbst **140**, 1923. — *Asada*, ebendaselbst **141**, **142**, 1923. — *Knoop*, Hofmeisters Beiträge **6**, 1905.

Über den Kalkgehalt von Organen kalkbehandelter Katzen. III[1]).

Von

H. Jungmann und **M. Samter.**

(Aus der chemischen Abteilung des pathologischen Instituts in Berlin.)

(Eingegangen am 13. November 1923.)

In früheren Veröffentlichungen von *Rona* und *Heubner*[2]) wurde eine Anzahl von Analysendaten gegeben, die in summa zu dem Ergebnis führten, daß nach intravenösen oder subkutanen Calciumgaben auch im Stadium deutlichster pharmakologischer Wirkung keine Vermehrung des Calciums in den Organen von Katzen zu finden war. Kaum schien eine andere Schlußfolgerung möglich, als daß ein wesentlicher Anteil des zugeführten Calciums sehr rasch in den Knochen abgelagert würde. Mit dieser Feststellung war für die Erkenntnis des Wesens der Calciumwirkung wenig gewonnen, und es blieb das Bedürfnis bestehen, das Beobachtungsmaterial zu vermehren, um entweder einen Zusammenhang zwischen Calciumwirkung und Calciumanreicherung mit absoluter Sicherheit auszuschließen, oder doch noch irgendwo einen solchen Zusammenhang aufzufinden. Nach zwei Richtungen waren die bisherigen Untersuchungen noch lückenhaft: Die *Ausscheidungen* der Tiere zwischen Calciuminjektion und Tod waren vernachlässigt worden, und es war somit, wenn auch als unwahrscheinlich, doch nicht als unmöglich erwiesen, daß die gesamte zugeführte Calciummenge binnen kurzer Frist den Körper wieder verlassen habe. Zweitens hatten die pharmakologischen Beobachtungen darauf hingedeutet, daß *ganz bestimmte* zentrale Funktionen, besonders die Erhaltung des Gleichgewichts und des Muskeltonus, ziemlich elektiv durch Calcium gestört würden, während die Analysen diejenigen Gehirnteile, in denen diese Funktionen lokalisiert sind, wie das Kleinhirn

[1]) Die Kosten der Untersuchung wurden zum Teil durch eine Zuwendung der *Notgemeinschaft der deutschen Wissenschaft* bestritten, der hierdurch öffentlich gedankt sei.

[2]) Diese Zeitschr. **93**, 353, 1919; **135**, 248, 1923.

oder den roten Kern des Mittelhirns, nicht besonders berücksichtigt hatten.

Wirkliche Klärung ist nur zu hoffen durch *zahlreiche* neue Analysenbefunde. Wir haben nur einen *Teil* der noch zu leistenden Arbeit vollbringen können. Wir analysierten nach *Jansens* Methode zahlreiche Organe von *zwei* Versuchstieren, die im pharmakologischen Institut Göttingen vorbehandelt waren, während ein kleinerer Teil des Materials von den *gleichen* Tieren durch *G. Hecht* analysiert wurde, worüber die folgende Mitteilung Auskunft gibt.

Versuch 1.

Kater von 3,3 kg erhielt am 15. Dezember 1922 nach 24stündigem Fasten intravenös eine Lösung von 4proz. $CaCl_2.6aq.$; nach Einlauf von 32 ccm (= 0,07 g Ca je Kilogramm) im Laufe von 20 Minuten kollabierte das Tier: Atemstillstand, sehr schlechter Herzschlag; doch erholte es sich im Laufe einiger Minuten unter sehr kräftiger künstlicher Atmung (ohne die es *sicher* gestorben wäre). Im Verlauf weiterer 10 Minuten wurden darauf noch 9 ccm der Lösung zugeführt, so daß das Tier im ganzen binnen 34 Minuten 0,09 g Ca je Kilogramm erhalten hatte. Beim Losbinden führte das Tier einige kräftige Bewegungen des Sträubens aus, lag aber danach wie gelähmt auf der Seite; doch hob es trotzdem mehrfach den Kopf, um Vorgänge in seiner Umgebung mit sichtlichem Interesse zu beobachten; auch versuchte es trotz völliger Lähmung der hinteren und starker Parese der vorderen Extremitäten zu beißen. Es wurde in einen gut gesäuberten Stoffwechselkäfig gesetzt; doch lag es eine Stunde nach Ende der Injektion noch völlig unbeweglich, schnupperte jedoch an einem vorgehaltenen Bündel Heu. Bei Vorhalten einer weißen Maus geriet das Tier sofort in Erregung, schlug mit der Vorderpfote nach der Maus, richtete Hals und Kopf auf und schnappte nach der Maus; nach dieser Anstrengung kollabierte es und lag mit röchelnder Atmung flach auf dem Bauch. 2½ Stunden nach Ende der Injektion wurde die Maus in den Käfig gesetzt, wo sie *sofort* gehascht und durch Abbeißen des Kopfes getötet wurde. Eine Viertelstunde später wurde der Kater aus der Carotis entblutet und seziert, dabei die Organe frisch gewogen und zur Analyse vorbereitet. Im Magen fand sich der im ersten Stadium der Verdauung befindliche Kopf der Maus mit etwa 1 ccm Magensaft, sonst war er völlig leer; er wurde unter der Wasserleitung abgespült und mit Filtrierpapier abgetupft. Dagegen wurde der gesamte Darmkanal bis zum Sphincter ani nach sorgfältiger Lösung vom Mesenterium *uneröffnet* in mehrere Abschnitte zerlegt und *mit* Inhalt analysiert. Die Blase war *vollkommen* leer und zusammengezogen. In der linken Niere fand sich eine große Zyste, deren Inhalt schätzungsweise 4 ccm harnähnlicher Flüssigkeit betrug, von der jedoch nur genau 1,0 ccm aufgefangen und analysiert wurde. Die Großhirnhemisphären wurden an den Hirnschenkeln vor dem Tentorium cerebelli abgetrennt und mit dem Finger sorgfältig auf etwa eingedrungene Knochensplitterchen abgetastet; darauf wurde das knöcherne Tentorium abgetragen und das Kleinhirn ebenfalls für sich vom Hirnstamm abgelöst (Mittelhirn und Medulla wurden nicht analysiert). Im Käfig fanden sich geringfügige Entleerungen des Tieres, denen es nicht anzusehen war, ob sie aus dem Magen oder dem Dickdarm stammten; sie wurden sorgfältig gesammelt und analysiert.

Die erhaltenen Zahlen finden sich in Tabelle I.

Tabelle I.
0,09 g Ca je Kilogramm als $CaCl_2$ intravenös vor 2½ Stunden.

Organ	Zur Analyse		Gefunden CaO	
	Minuten nach d. Tode	g	mg	mg-Proz.
Muskeln:				
Rechter Quadriceps, oberes Drittel	254	13,28	1,37	10,3
„ „ untere zwei Drittel	256	21,05	3,25	15,4
Linker Quadriceps, unterer Zipfel	258	5,24	0,81	15,5
„ „ Stück aus der Mitte	260	2,61	0,50	(19,3)
„ „ „ „ „ „	262	2,78	0,56	(20,1)
„ „ „ „ „ „	265	6,60	1,02	15,5
Großhirn, linke Hemisphäre	239	9,56	1,60	16,7
„ rechte „	240	10,33	1,85	17,9
Kleinhirn	248	3,92	1,82	(46,4)
Rechte Niere	215	12,95	11,79	91,0
Linke Niere (ohne Cystenflüssigkeit)	217	10,78	4,64	43,1
Magen (entleert)	205	34,92	7,97	22,8
Dünndarm (mit Inhalt) oberstes Stück	188	18,75	4,43	23,6
„ „ „ zweites „	185	19,09	5,10	26,7
„ „ „ drittes „	182	25,18	6,44	25,6
„ „ „ unterstes „	178	22,72	5,91	26,0

Zu diesen Zahlen ist zu bemerken: Die höchsten Werte für Muskulatur oder Hirnsubstanz wurden an den kleinsten Organstücken gefunden; sie sind daher vermutlich durch Fehler entstellt, wie bereits durch *Heubner* und *Rona* ausgeführt wurde[1]). Die übrigen Werte gehen nicht über den Rahmen hinaus, der für den Muskel- und Hirnkalk normaler Tiere gegeben ist, wenn sie auch bis zum Dreifachen der vorkommenden Minimalwerte gehen. Bei dem Wert für das *Kleinhirn* ist auch an die Gefahr einer Beimischung von Knochensubstanz zu denken, die wegen der Verknöcherung des Tentoriums gerade bei Katzen besonders zu beachten ist; wären diese Bedenken nicht, so würde die Zahl für das Kleinhirn die Annahme nahe legen, daß die auffällige Gleichgewichtsstörung und Tonusverminderung bei der Calciumvergiftung durch eine besondere Calciumanreicherung im Kleinhirn bedingt sei, dessen Funktionen eben dadurch bevorzugt gelähmt würden. Künftige Untersuchungen werden in erster Linie die Entscheidung dieser Frage ins Auge fassen müssen. — Außerordentlich hoch ist auch der Kalkgehalt der *Nieren* bei dieser intravenös vergifteten Katze gegenüber den früher von *Heubner* und *Rona* untersuchten, subkutan behandelten Tieren. Demgegenüber sind die Werte für den Dünndarm — wenn überhaupt — nur sehr wenig höher; be-

[1]) Diese Zeitschr. 135, 249, 1923.

merkenswert ist der gleichmäßige Kalkgehalt über die gesamte Länge des Dünndarms, während an drei Normaltieren die *unteren* Abschnitte regelmäßig *ärmer* an Calcium waren als die oberen[1]).

Versuch 2.

Katze von 2,75 kg, seit 24 Stunden nicht mehr ganz normal, frißt mit geringer Gier, hat das Fell gesträubt; erhält am 23. Mai 1923 intravenös eine 6,7 proz. Lösung von *fructosemonophosphorsaurem Calcium* (der Firma Farbenfabriken vorm. Friedr. Bayer u. Co., Elberfeld-Leverkusen, der für ihr Entgegenkommen auch hier herzlich gedankt sei); das Präparat war lufttrocken durch *G. Hecht* analysiert worden und hatte einen Gehalt von 12,0 Proz. Ca ergeben. Eine Analyse der Lösung hatte überdies den diesen Daten entsprechenden Wert von 0,80 Proz. Ca geliefert. Die Injektion von 22,5 ccm (mit 0,065 g Ca je Kilogramm) dauerte 13 Minuten; 5 Minuten später (nach dem Abbinden) zeigte sich das Tier etwas hinfällig, leicht ermüdbar und taumelte stark beim Laufen. Diese Symptome der Ataxie und Tonusschwäche verstärkten sich noch im Laufe der folgenden Stunden, während das Bewußtsein und auch die Fähigkeit, zu springen, erhalten blieben. Das Tier erbrach und entleerte dabei Reste eines vor etwa 9 Stunden gefressenen Meerschweinchens. 4½ Stunden nach Ende der Injektion wurde das Tier aus der Carotis entblutet, lieferte jedoch nicht mehr als 14 ccm Blut. Bei der Sektion war die Blase völlig leer. Enddarm und Magen wurden möglichst sorgfältig von ihrem Inhalt getrennt, mit etwas destilliertem Wasser gewaschen und mit Filtrierpapier abgetupft. Der Dünndarm wurde wieder als Ganzes in einige Abschnitte geteilt, die *mit* ihrem Inhalt zur Analyse kamen. Die Herausnahme des Gehirns erfolgte wieder mit aller Vorsicht zur Vermeidung von Knochenbeimischung.

Tabelle II gibt die erhaltenen Zahlen.

Die Zahlen liefern ein interessantes Gegenstück zu denen des Versuchs 1, wie überhaupt zu allen bisher bekannt gewordenen; am auffälligsten zeigt sich dies in der *Leber*, deren Calciumgehalt mit 90 bis 100 mg-Proz. CaO die drei von *Heubner* und *Rona* mitgeteilten, einwandfreien Fälle subkutaner Calciumvergiftung um mindestens das Sechsfache übertrifft. In dem fructosephosphorsauren Salze hat man also eine Form des Calciums vor sich, die der Anreicherung in Organen viel günstiger ist als Chlorcalcium. Dem entspricht es, daß sich auch in Enddarm, Niere und Gehirn Werte finden, die — wenn auch nicht so viel — doch deutlich höher sind als die bisher ermittelten. Die Zahl für das Mittelhirn und Kleinhirn weicht zu wenig von derjenigen für die eine Großhirnhälfte ab, als daß sich ein Schluß darauf gründen ließe. — Unter den Muskelwerten wird man wohl die beiden höchsten, die an den kleinsten Substanzmengen erhalten wurden, als fehlerhaft ausschalten müssen; die übrig bleibenden geben jedoch noch immer das Bild sehr großer Variationen (um mindestens das Vier- bis Fünffache). Vielleicht darf man daraus entnehmen, daß die höheren Werte

[1]) Vgl. *Heubner* und *Rona*, diese Zeitschr. **185**, 260 (auch 267).

Tabelle II.

0,065 g Ca als fructosephosphorsaures Calcium intravenös vor 4½ Stunden.

Organ (Gesamtgewicht)	Zur Analyse		Gefunden CaO	
	Minuten nach d. Tode	g	mg	mg-Proz.
Muskeln:				
Linker Quadriceps	29	16,54	3,60	21,8
Rechter „	58	8,01	2,27	28,3
„ „	60	7,11	2,78	39,1
„ „	62	3,51	2,27	(64,8)
Linker Adduktor	32	11,13	1,41	12,3
„ „	33	11,63	1,68	14,5
Rechter „	65	13,31	0,90	6,8
Linker Biceps femoris	56	3,42	1,72	(51,3)
Rechter „ „	68	12,50	0,56	4,4
Linke Wade	75	15,56	2,43	15,5
Rechte „	72	15,79	2,50	15,9
Leber (60,0 g = 21,8 Prom.)	82	13,06	11,68	89,3
„	83	10,42	10,66	102,1
Gehirn (27,94 g = 10,1 Prom.):				
Linke Hemisphäre	48	9,36	1,37	14,6
Rechte „	50	9,51	2,74	28,8
Mittelhirn, Brücke, Kleinhirn und Vorderteil der Medulla obl.	52	8,96	2,78	31,0
Rechte Niere	106	8,87	9,09	102,5
Dünndarm (93,5) oberstes Stück	93	22,78	16,47	72,2
Enddarm (leer)	90	23,62	16,07	68,1

auch durch Anhäufung des injizierten Calciums bedingt sind, da die niedrigsten Zahlen dem Minimum normaler Tiere entsprechen. In früheren Versuchen wurden ja häufig auch Unterschiede im Kalkgehalt verschiedener Muskeln des gleichen Tieres gefunden, doch waren sie nie so groß; man würde also auch für die Muskeln ein neuartiges Verhalten gegenüber dieser Form des Calciums anzunehmen haben.

Über den Kalkgehalt von Organen kalkbehandelter Katzen. IV[1]).

Von

Gerhard Hecht.

(Aus dem pharmakologischen Institut zu Göttingen.)

(Eingegangen am 13. November 1923.)

Mit 1 Abbildung im Text.

I.

Im Anschluß an vorstehende Mitteilung von *Jungmann* und *Samter* seien zunächst einige ergänzende Befunde wiedergegeben, da ich einen Teil der Organe und Ausscheidungsprodukte der *gleichen* Tiere auf Calcium untersuchte. Meine Analysen wurden jedoch nach einer etwas abweichenden Methode ausgeführt, nämlich prinzipiell nach *de Waard* in der Form, wie ich sie kürzlich genauer beschrieben habe[2]). Da diese Methode am besten für kleine Mengen geeignet ist, habe ich in den meisten Fällen die Lösung der Organasche im Meßkolben aufgefüllt und nur Bruchteile davon analysiert; dies bot überdies die Möglichkeit *wiederholter* Bestimmung, die ich mehrmals ausgenutzt habe. In einigen Fällen habe ich auch die Titration mit Permanganat durch die Gewichtsanalyse des ausgefällten Calciumoxalats (als CaO im Mikroplatintiegel) kontrolliert. Die gefundenen Zahlen geben Tabelle I und II.

Tabelle I.

Versuch vom 15. Dezember 1922: Kater 3,3 kg; 0,09 g Ca je Kilogramm als $CaCl_2$ intravenös vor $2\frac{1}{2}$ Stunden.

Material (Gewicht g)	Von der Aschenlösung analysiert Proz.	ccm 0,00965 n Kaliumpermanganat oder mg CaO	In der Gesamtasche gefunden mg CaO
Enddarm mit Inhalt (26,76) . .	2	5,10 ccm	68,9
Kot aus dem Käfig	4	4,81 ,,	32,5
,, ,, ,, ,, ...	40	13,1 mg	32,8
Cystenflüssigkeit der linken Niere (1 ccm)	100	0,88	0,24
Mageninhalt (Mäusekopf)	4	6,40 ccm	43,2
,, ...	20	8,7 mg	43,5

[1]) Die Kosten der Untersuchung wurden durch eine Zuwendung der *Notgemeinschaft der deutschen Wissenschaft* bestritten, der hierdurch öffentlich gedankt sei.

[2]) Diese Zeitschr. **148**, 342, 1923.

Die Zahlen erlauben, in Gemeinschaft mit denen von *Jungmann* und *Samter* eine vollkommene Bilanz des zugeführten Calciums aufzustellen: Nach der Calciuminjektion mit insgesamt 416 mg CaO hat das Tier durch die Drüsen des Enddarms und Nierensekretion bis zum Tode allerhöchstens 102 mg CaO abgegeben; denn dabei ist der normale Gehalt der Enddarm*wand* nicht abgezogen und außerdem der *gesamte* Kalk als *frisch* ausgeschieden gerechnet.

Auf Vermehrung des Nierenkalks können nicht mehr als 15, auf Vermehrung des Dünndarmkalks nicht mehr als 13 mg CaO gerechnet werden. Demnach sind mindestens 286 mg, d. h. 8,7 mg CaO auf 100 g Körpersubstanz im Innern des Tieres zurückgeblieben. Die Muskeln enthielten im Mittel 15,5 mg-Proz.; dieser Wert liegt nur um etwa 5 mg höher als der *Durchschnitt* bei normalen Muskeln, doch läßt sich wegen der vorkommenden großen individuellen Schwankungen[1]) nicht mit Bestimmtheit ausschließen, daß die Muskeln dieses Tieres vor der Vergiftung einen dem *Minimalwert* von 5 mg-Proz. CaO gleichen oder angenäherten Kalkgehalt besaßen. Es ist also möglich, daß die Muskulatur von der überschüssig im Körper vorhandenen Calciummenge etwa so viel aufgenommen hat, als ihrem Gewichtsanteil im Körper entspricht. Falls sich alle übrigen Organe ebenso verhalten haben, und *auch* die Knochensubstanz, die ja gewichtsmäßig ebenfalls einen bedeutenden Anteil des Körpers ausmacht, so wäre der Verbleib des zugeführten Calciums aufgeklärt. Man kann die Ergebnisse der Analysen also kaum ohne die Annahme deuten, daß ein Teil des zugeführten Calciums sehr rasch in den Knochen abgelagert wird, und muß sogar extrem günstige Voraussetzungen machen, will man die Annahme einer *reichlicheren* Ablagerung, als dem gewichtsmäßigen Anteil der Knochen entspricht, vermeiden[2]). Allerdings ist bei diesem Überschlag nicht berücksichtigt, daß *manche* — noch nicht hinreichend untersuchte — Organe vielleicht wesentlich *mehr* überschüssiges Calcium aufzunehmen vermögen als 8,7 mg CaO auf 100 g, wie es z. B. für die *Haut* wahrscheinlich geworden ist, die ja auch quantitativ ins Gewicht fallen würde (vgl. unten S. 276); dennoch würde auch dies nur eine relativ geringfügige Verschiebung der Betrachtung bedingen und sie prinzipiell kaum umstoßen.

Zu den Zahlen der Tabelle II, die eine Ergänzung zu dem zweiten Versuch von *Jungmann* und *Samter* liefern, sei folgendes bemerkt: Stücke des rechten *Adductors* wurden in gleicher Größe von verschiedenen Untersuchern in zwei verschiedenen Instituten mit verschiedener Methode analysiert; die erhaltenen Werte waren 6,8 und 7,1 mg-Proz.

---

[1]) Vgl. *Heubner* und *Rona*, diese Zeitschr. **135**, 255ff., 1923.
[2]) Vgl. ebendaselbst, S. 275.

CaO: das Vertrauen zu der methodischen Zuverlässigkeit der Bestimmungen wird dadurch erhöht. Andererseits beweist die starke Abweichung in den Werten für den linken Biceps von neuem, daß die Methode von *Jansen* bei kleinen Organmengen versagt und daß solche Analysen zu streichen sind.

Tabelle II.

Versuch vom 23. Mai 1923: Katze 2,75 kg; 0,065 g Ca je Kilogramm als fructosephosphorsaures Calcium intravenös vor 4½ Stunden.

Material	Zur Veraschung genommen (frisch)	Von der Aschenlösung analys. Proz.	ccm 0,00965 n $KMnO_4$ oder mg CaO	In der Gesamtasche gefunden CaO mg	mg-Proz.
Blutserum	5,2 ccm	100	17,05 ccm	4,61	88,6
Blutzellen (+ Serum)	8 „	100	6,35 „	1,71	21,6
M. Biceps femoris sin.	3,03 g	100	1,57 „	0,42	14,0
„ „ „ „	2,60 g	100	1,36 „	0,36	14,2
M. Adductor dext.	13,33 g	40	1,42 „	0,97	7,1
Magen (ohne Inhalt)	33,99 g	10	4,49 „	12,12	35,7
Dünndarm (mit Inhalt) zweitoberstes Stück .	22,11 g	20	20,15 „	27,2	123,7
„ „ „ .	22,11 g	40	11,0 mg	27,4	
„ drittes Stück	24,23 g	5	9,67 ccm	26,2	107,8
„ unterstes Stück . . .	24,18 g	100	32,2 mg	32,2	133,0
Gallenblase mit Inhalt	4,12 g	100	9,22 ccm	24,9	60,5
Inhalt des Enddarms	—	4	11,68 „	78,4	—
Kot aus dem Käfig	—	2,5	15,10 „	163,0	—
„ „ „ „	—	50	81,4 mg	163,3	—
Harn (wenig)	—	10	2,89 ccm	8,1	—

Sehr wichtig ist der hohe Gehalt des *Blutserums* an Calcium, das demnach eine Parallele zu dem Verhalten der Leber liefert. Während nach intravenöser Zufuhr von Calciumchlorid der maximale Wert im Serum (im Laufe der ersten halben Stunde) etwa 40 mg-Proz. CaO beträgt, um sich dann langsam der Norm wieder zu nähern und jedenfalls nicht allzu hoch über der Norm zu halten[1]), findet sich hier noch nach 4½ Stunden der Wert von fast 90 mg-Proz. CaO, das 5½fache der Norm (16 mg-Proz. CaO). Diese Erscheinung ist recht interessant, besonders auch deshalb, weil *in vitro* beim Versetzen einer Lösung des fructosemonophosphorsauren Calciums mit Oxalat das Calcium fast *restlos* niedergeschlagen wird; es ist also in leicht ionisierbarer Form vorhanden, verläßt aber trotzdem die Blutbahn viel langsamer. Wie dies zustande kommt, ist mehrfacher Deutung fähig, bedarf daher weiterer Untersuchung.

[1]) Vgl. *Heubner* und *Rona*, diese Zeitschr. **93**, 187, 199ff., 1919.

Zu einer Bilanzaufstellung eignet sich dieser Versuch nicht, weil das Tier leider wenige Stunden vor der Kalkzufuhr Stücke eines Meerschweinchens mit Knochen gefressen hatte und daher im Verdauungskanal kalkreichen Speisebrei trug. In der Tat übertrifft die allein im Dünndarm gefundene Kalkmenge — selbst nach Abzug von etwa 125 mg CaO für den *normalen* Gehalt — die zugeführte Kalkmenge (im Dünndarm 437, zugeführt 250 mg CaO).

II. Chronische Calciumvergiftung.

In weiteren Versuchen suchte ich das Material über den Erfolg *wiederholter* Calciumzufuhr zu vermehren, weil die Untersuchungen von *Heubner* und *Rona*[1]) noch einige Punkte zweifelhaft gelassen hatten. Es hatte sich bei den damaligen, relativ spärlichen Analysen gezeigt, daß Herz und Leber chronisch behandelter Tiere eine Andeutung *vermehrten* Kalkgehaltes gaben. Außerdem wurde auf Grund der Analyse von *Jungmann* und *Samter* an dem Kleinhirn des *akut* mit Chlorcalcium vergifteten Tieres ihres Versuchs 1[2]) das *Gehirn* der Tiere in verschiedenen Teilen untersucht, ferner das Fettgewebe des Netzes als Beispiel einer noch nicht berücksichtigten Gewebsart; es schien von vornherein nicht unmöglich, daß gerade bei wiederholter Zufuhr eine Anhäufung des Calciums im Fette erfolgt. Endlich wurden (nach sorgfältigem Rasieren) Stücke der *Haut* (vom Bauche) analysiert, nachdem das Unterhautfettgewebe möglichst gut abpräpariert war.

Zur Injektion diente Calcium aceticum [der Firma Gehe & Co. in Dresden[3])], dessen Calciumgehalt durch eigene Analysen genau bestimmt wurde. Die Bestimmung in den Organen geschah immer nach der modifizierten Methode von *de Waard*[4]).

Die beiden Versuche sollten zugleich der Prüfung einer weiteren Beobachtung von *Heubner* und *Rona* dienen: sie fanden bei wiederholter *subkutaner* Calciumzufuhr regelmäßig eine *Gewichtszunahme* ihrer Tiere im Laufe der ersten Woche[5]). Da diese Applikationsart stets *lokale* Schädigung, Infiltration und vorübergehend ödematöse Durchtränkung der Nachbarschaft herbeiführt, schien es geboten, wiederholte *intravenöse* Calciuminjektionen zu versuchen. Da dies ohne wiederholte operative Eingriffe, zum Teil am gleichen Orte, nicht abgeht und Infektionen schwer zu vermeiden sind, läßt sich ein ganz konstantes Gewicht nicht erwarten. Dennoch spricht der Ausfall der Versuche, der aus der beigegebenen Kurventafel abzulesen ist, entschieden *gegen* eine Wirkung des Calciums auf den Wasserhaushalt oder den Ansatz von Körpersubstanz; die früher beobachtete Gewichtszunahme muß

[1]) Diese Zeitschr. **135**, 269ff., 1923.
[2]) Vgl. vorige Mitteilung, S. 267.
[3]) Der Firma sei für die Überlassung des Präparats bestens gedankt!
[4]) Vgl. oben, S. 270.
[5]) Vgl. a. a. O. **135**, S. 269f.

also wohl den Folgen der *lokalen* Schädigung zugeschrieben werden. (Allerdings besteht noch die Möglichkeit, daß sich Calcium*chlorid* auch bei intravenöser Zufuhr anders verhalten würde als das angewandte Acetat; aber auch dann würde es sich nicht um eine Calciumwirkung handeln.)

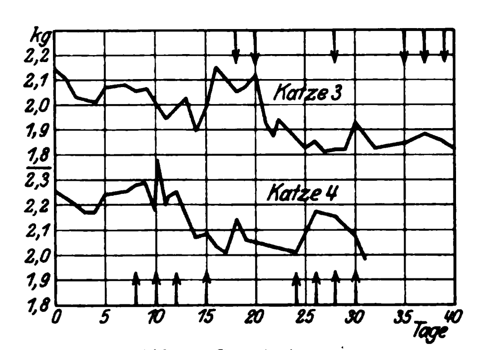


Abb. 1. Gewichtskurven.
↓↑: Calciuminjektion je 0,025 g Ca auf das Kilogramm als Acetat intravenös.

Versuch 3.

Katze, Gewicht vom 31. Mai bis 18. Juni 1923 zwischen 1,90 und 2,16 kg schwankend, erhielt unter sterilen Kautelen am 18. und 20. Juni 26 ccm einer Calciumacetatlösung mit 0,21 Proz. Ca in die Halsvene. Am 23. Juni wurde Abszeßbildung am Halse bemerkt; das Tier fraß nicht. Nachdem es sich erholt hatte, wurden neue Injektionen an Hals- und Beinvenen ausgeführt: am 28. Juni 1923 und am 5., 7. und 9. Juli je 24 ccm. Am 10. Juli wurde das Tier bei einem Gewicht von 1,83 kg durch Entbluten getötet. Es hatte also im Laufe der letzten 22 Tage etwa 0,16 g Ca je Kilogramm, davon die Hälfte während der letzten 5 Tage erhalten.

Die Analysen ergeben die in Tabelle III verzeichneten Werte.

Tabelle III.

Organ	Zur Veraschung genommen (frisch)	Von der Aschenlösung analysiert Proz.	ccm 0,00965 n $KMnO_4$	In der Gesamtasche gefunden CaO mg	mg-Proz.
Blutserum	10 ccm	100	5,98	1,61	16,1
Leber	12,85 g	20	0,67	0,86	6,7
,,	5,83 g	100	1,85	0,50	8,6
,,	5,92 g	100	1,09	0,29	4,9
,,	2,00 g	100	0,86	0,23	11,6
,,	0,95 g	100	0,24	0,065	6,9
Herz	9,66 g	100	2,94	0,79	8,2
Linke Großhirnhemisphäre	10,16 g	100	3,46	0,93	9,2
Rechte ,,	10,24 g	100	2,98	0,80	7,9
Hirnstamm (Oblongata bis Thalamus)	5,54 g	100	1,97	0,53	9,8
Kleinhirn	3,97 g	100	1,14	0,31	7,8
Netz	7,66 g	100	2,01	0,54	[7,1][1])
Haut, linke Bauchseite	5,23 g	100	3,40	0,89	17,0
,, rechte Rückenseite	2,36 g	100	1,55	0,42	17,7

[1]) Geringe Verluste bei der Veraschung!

Versuch 4.

Katze mit einem Gewicht von 2,17 bis 2,28 kg zwischen dem 11. und 19. Juni 1923 erhielt an diesem Tage, sowie am 21. und 23. Juni je 27, am 26. Juni und 5. Juli je 25, am 7., 9. und 11. Juli je 26 ccm der Calciumacetatlösung mit 0,21 Proz. Ca intravenös. Sichtbare Anzeichen einer Infektion wurden nicht bemerkt. Am 12. Juli wurde das Tier bei einem Gewicht von 1,98 kg durch Entbluten getötet. Die Calciumdosis betrug also etwa 0,20 g Ca je Kilogramm, wovon die Hälfte auf die letzten 7 Tage vor dem Tode kam. Tabelle IV gibt die analytischen Befunde.

Tabelle IV.

Organ	Zur Veraschung genommen (frisch)	Von der Aschenlösung analysiert Proz.	ccm 0,0095 n $KMnO_4$	In der Gesamtasche gefunden CaO mg	In der Gesamtasche gefunden CaO mg-Proz.
Blutserum	10 ccm	100	5,05	1,36	[13,6][1])
Leber	17,13 g	20	0,68	0,92	5,4
„	5,71 g	100	1,38	0,37	6,5
„	1,13 g	100	0,56	0,15	13,3
Herz	7,76	100	1,73	0,48	6,2
Linke Großhirnhemisphäre	8,28 g	100	2,23	0,60	7,3
Rechte „	8,47 g	100	2,36	0,64	7,5
Hirnstamm	5,60 g	100	1,65	0,45	8,0
Kleinhirn	3,90 g	100	1,16	0,31	8,0
Netz	2,06 g	100	1,22	0,33	16,0
Haut	4,09 g	100	2,34	0,63	15,5
„	5,64 g	100	3,76	1,02	18,0

Die Ergebnisse an Leber und Herzen erweisen eindeutig, daß die von *Heubner* und *Rona* bei chronischer Vergiftung zuweilen gefundenen höheren Zahlen *Zufallsbefunde* waren, wie sie auch bereits von den Autoren — obwohl mit Vorsicht — bewertet wurden. Beide Tiere haben für Teile der Leber Zahlen geliefert, die den *niedrigsten* an Normaltieren gefundenen gleichkommen. Freilich sind in *derselben* Leber einzelne Werte höher gefunden worden, doch keineswegs über die normale Breite hinaus. *Heubner* und *Rona* hatten zwar in der Leber des gleichen Tieres — wohl zufällig — leidlich übereinstimmende Zahlen ermittelt, an anderen Organen jedoch ebenfalls zuweilen auffällige Differenzen. Es kann wohl kein Zweifel darüber sein, daß an gewissen Stellen der Gewebe — auch ohne *sichtbare* Verkalkung — Calcium gespeichert werden kann.

Die Zahlen für die verschiedenen Gehirnabschnitte lagen in meinen zwei Versuchen recht gut beisammen. Damit ist erwiesen, daß das Kleinhirn bei chronischer Calciumzufuhr — und demnach auch in der

[1]) Wert durch einige beigemischte Erythrocyten entstellt (zu niedrig!).

Norm — keinen höheren Calciumgehalt aufweist als die übrigen Hirnteile. Der Befund von *Jungmann* und *Samter* bei dem akut vergifteten Tiere ihres Versuchs 1 verdient also gründliche Nachprüfung.

Im *Fettgewebe* fand sich bei meinen Tieren etwa der gleiche Kalkgehalt wie im Blute. Bedeutet dies auch für den *wässerigen* Anteil dieses Gewebes eine wesentlich höhere Konzentration, so kann doch das Gewebe im ganzen nicht als ein Depot für Calcium betrachtet werden.

III. Haut.

Recht bemerkenswert sind demgegenüber die Befunde an der *Haut*, vor allem im Zusammenhang mit zwei früheren Analysen von *Heubner* und *Rona*[1]) an *akut* vergifteten Tieren. Aus diesem Grunde unternahm ich noch eine Analyse an einer Katze (von 2,58 kg), die überhaupt kein Calcium bekommen hatte. Jedoch war das Tier nicht völlig gesund, sondern nach intravenöser Injektion von 0,14 g SiO_2 in kolloidaler, doch rein anorganischer Lösung (Präparat „313" der Firma Heyden) im Laufe eines halben Tages zugrunde gegangen. Die Haut der Leiche wurde sorgfältig rasiert und vom Fettgewebe befreit: die analytischen Daten waren:

Tabelle V.

Zur Veraschung g frische Haut	Von d. Aschenlösung analysiert Proz.	ccm 0,00965 n $KMnO_4$	Gefunden i. d. Gesamtasche CaO	
			mg	mg-Proz.
26,35	20	2,59	3,50	13,3
28,32	20	2,57	3,47	12,2

Auf Grund des nunmehr vorliegenden Materials läßt sich folgende Zusammenstellung über den Calciumgehalt der Haut machen:

Versuch 5 (*Hecht*): *ohne* Calciumzufuhr . .	12,8 mg-Proz.	CaO
3 „ chronische „ . .	17,4 „	„
„ 4 „ „ „ . .	16,8 „	„
„ 13 (*Heubner* und *Rona*): akute Calciumvergiftung . .	36,1 „	„
„ 14 (*Heubner* und *Rona*): akute Calciumvergiftung . .	34,0 „	„

Es scheint also, als ob die Haut, und zwar die *Cutis* (mit Epidermis), bei reichlicher Calciumzufuhr reichlich Calcium aufnehme und festhalte. Sie würde sich dadurch von allen übrigen untersuchten Organen (mit Ausnahme der Ausscheidungsorgane Darm und Nieren) wesentlich unterscheiden. Die Frage ist vielleicht noch nicht endgültig entschieden, weil die beiden akut vergifteten Tiere zwecks Enthaarung zwei Tage

[1]) a. a. O., S. 268.

vor dem Tode mit *Strontiumsulfid* behandelt worden waren, die übrigen aber *rasiert* wurden; es bleibt also noch auszuschließen, daß Strontium so lange in der Haut haften bleibt und infolgedessen als Calcium mitbestimmt wurde. Ob die *wenig* höheren Zahlen bei den chronisch behandelten Tieren einem Zufall oder einer konstanten Regel entsprechen, muß ebenfalls erst durch Vermehrung der Analysen entschieden werden. Die Frage besitzt natürlich großes Interesse wegen der therapeutischen Erfolge der Calciumtherapie bei gewissen Hautentzündungen und wegen der bekannten experimentellen Befunde von *Luithlen*[1]) über die Änderung der entzündlichen Reaktion der Haut bei Änderung der Mineralzufuhr.

Zusammenfassung.

1. Bei intravenöser Injektion von Chlorcalcium steigt der Kalkgehalt der *Niere* wesentlich höher an als bei subkutaner.

2. Dennoch reicht die in den Ausscheidungen, Ausscheidungsorganen und sonstigen weichen Organen anzutreffende Calciummenge kaum aus, um Aufklärung über den Verbleib des Calciums zu geben; die Annahme einer Ablagerung in den Knochen erscheint unausweichlich.

3. Nach intravenöser Zufuhr von fructosephosphorsaurem Calcium findet sich im Blutserum und in der Leber ein etwa sechsmal höherer Gehalt an Calcium als in der Norm oder nach subkutanen Chlorcalciumgaben.

4. Bei akuter Calciumvergiftung scheint die *Haut* ihren Kalkgehalt wesentlich zu erhöhen; doch bedarf der Befund weiterer Erhärtung.

5. Wiederholte intravenöse Calciumzufuhr (in Form des Acetats) führt *nicht* zu erkennbaren Veränderungen des Organkalks, auch nicht in der Leber und im Herzen.

6. Bei dieser Applikationsform *fehlt vollkommen* der Einfluß auf die Gewichtskurve der Tiere, der bei subkutanen Chlorcalciuminjektionen bemerkt wurde.

---

[1]) Wiener klin. Wochenschr. **1911**, Nr. 20.

Beitrag zum Verhalten von Calcium, Kalium, Chlor und Phosphor in der Milch und zur Technik der Ultrafiltration.

Von

Chienchi Wha (China).

(Aus der chemischen Abteilung des pathologischen Instituts der Charité Berlin.)

(Eingegangen am 13. November 1923.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Über die Art, in der die einzelnen Aschenbestandteile in der Milch enthalten sind, liegen bereits eine Reihe von Untersuchungen vor. Namentlich die Bindungsform des Calciums ist der Gegenstand mehrerer experimenteller Arbeiten (1) gewesen, während über das Kalium und Natrium die Angaben nur spärlich sind.

Von neueren Autoren, die über den Zustand des Calciums in der Milch gearbeitet haben, sind namentlich *Rona* und *Michaelis* (2) zu nennen. Nach den Befunden dieser Autoren betragen die Werte für den diffusiblen Kalk etwa 40 bis 50 Proz. des Gesamtkalkes der Milch, und der Rest ist in kolloidaler Form in der Milch vorhanden; demnach befindet sich das Calcium in zweierlei Form in der Milch.

In meinen eigenen Versuchen (angewendet wurde stets Kuhmilch) habe ich zunächst die Angabe von *Rona* und *Michaelis* nachgeprüft, wobei ich im ersten Teil meiner Untersuchungen die Methode der osmotischen Kompensationsdialyse (3) benutzt habe. Das Calcium wurde bei diesen Versuchen nach der Methode von *de Waard* (4) bestimmt.

Als Außenflüssigkeit bei den Dialysen wurde a) Labmolke, b) Eisenmolke, c) Säuremolke benutzt.

a) Bei der Darstellung der Labmolke wurden 50 ccm frischer Kuhmilch (mit 0,1648 Proz. CaO) mit 3 ccm einer zehnfach verdünnten Lösung von käuflichem Labpulver versetzt, nach der Gerinnung wird filtriert, auf dem Wasserbade auf 50 ccm eingeengt. Die so gewonnene Labmolke enthält 0,046 Proz. CaO, d. h. 28 Proz. von dem der urspründlichen Milch.

b) Bei der Darstellung der Eisenmolke wurden 100 ccm frischer Kuhmilch (mit 0,1648 Proz. CaO) mit 130 ccm destillierten Wassers und 70 ccm kolloidalen Eisenhydroxyds versetzt, das abgenutschte Filtrat (183 ccm) auf dem Wasserbade auf 61 ccm eingeengt. Diese eingeengte Eisenmolke enthielt 0,1912 Proz. CaO (nach Umrechnung 70 Proz. von dem der ursprünglichen Milch).

c) Bei der Darstellung der Säuremolke wurden 50 ccm der frischen Kuhmilch (mit 0,1648 Proz. CaO) mit 10 ccm 5proz. Essigsäure versetzt, das Filtrat auf dem Wasserbade auf 50 ccm eingeengt. Diese Molke enthielt 0,125 Proz. CaO, d. h. 76 Proz. von dem der frischen Milch.

Dialysenversuche.

Als Dialysierhülsen wurden sowohl solche aus Kollodium, als auch solche aus Pergament benutzt.

Als Innenflüssigkeit dienten 10 ccm frischer Milch, als Außenflüssigkeit 5 ccm Molke (oder destilliertes Wasser). Als Desinfektionsmittel wurde überall Toluol zugefügt. Dauer der Dialyse 24 Stunden. Die Versuche schildern die folgenden Tabellen.

Versuch 1.

Dialyse gegen destilliertes Wasser.

Proz. CaO in der Außenflüssigkeit (destilliertes Wasser)		Proz. CaO in der Innenflüssigkeit (Milch)		
vor	nach	vor	nach	
—	0,0950	0,1648	0,1064	Kollodium
—	0,0964	0,1648	0,1050	Kollodium
—	0,0942	0,1648	0,1120	Pergament
—	0,0930	0,1648	0,1078	Pergament
Mittel: —	0,0947	0,1648	0,1078	

Wie der Versuch zeigt, verhalten sich Kollodium- und Pergamentmembran gleich. Bei dieser Versuchsanordnung (24stündige Dialyse) waren innen (Milch) etwa 10 Proz. CaO mehr als außen.

Versuch 2.

Dialyse gegen Labmolke.

Proz. CaO in der Außenflüssigkeit (Labmolke)		Proz. CaO in der Innenflüssigkeit (Milch)	
vor	nach	vor	nach
0,046	0,1095	0,1648	0,1400
0,046	0,1081	0,1648	0,1300
0,046	0,1148	0,1648	0,1352
0,046	0,1152	0,1648	0,1428
Mittel: 0,046	0,112	0,165	0,138

Versuch 3.

Dialyse gegen Säuremolke.

Proz. CaO in der Außenflüssigkeit (Säuremolke)		Proz. CaO in der Innenflüssigkeit (Milch)	
vor	nach	vor	nach
0,125	0,1313	0,1648	0,1540
0,125	0,1341	0,1648	0,1610
0,125	0,1335	0,1648	0,1582
0,125	0,1363	0,1648	0,1596
Mittel: 0,125	0,134	0,1648	0,1582

Versuch 4.

Dialyse gegen Eisenmolke.

Proz. CaO in der Außenflüssigkeit (Eisenmolke)		Proz. CaO in der Innenflüssigkeit (Milch)	
vor	nach	vor	nach
0,1912	0,1653	0,1627	0,1778
0,1912	0,1607	0,1627	0,1743
Mittel: 0,1912	0,1630	0,1627	0,1760

Im allgemeinen ergibt sich, daß bei dieser Versuchsanordnung (langdauernde Dialyse) der größte Teil des Calciums der Milch diffusibel wurde.

Es ist naheliegend, diesen Befund auf das Sauerwerden der Milch während des Versuchs zurückzuführen. Diese Annahme wird durch den folgenden Versuch noch gestützt.

Nicht aufgekochte Milch (100 ccm) wurde mit destilliertem Wasser auf 500 ccm verdünnt, 24 Stunden stehengelassen, filtriert. Die klare saure Molke wurde auf dem Wasserbade auf 100 ccm eingeengt. Sie enthielt 0,1646 Proz. CaO gegen 0,1646 Proz. CaO in der frischen Milch.

Infolge des Sauerwerdens der Milch gingen also 100 Proz. des Ca der ursprünglichen Milch in die Molke über (gegen 28 Proz. in der Labmolke).

Meine nächste Aufgabe war daher, die Trennung des diffusiblen und nicht diffusiblen (kolloidalen) Teiles des Calciums möglichst schnell, ohne eine Änderung der Reaktion der Milch durchzuführen. Hierzu habe ich zwei Verfahren A und B angewendet.

Bei den folgenden Versuchen wurde die Milch nicht mit Toluol, sondern mit Formalin (zu 0,05 Proz.) versetzt.

A. Hierzu sind nötig: 1. ein Trichter von etwa 5,5 cm Durchmesser, 2. eine Siebplatte aus Porzellan, Durchmesser etwa 2 cm, 3. zwei aschefreie Filter (*Schleicher* und *Schüll*). Filter *a* mit einem Durchmesser von etwa 5 bis 6 cm, Filter *b* mit einem Durchmesser von etwa 11 bis 12 cm. Diese Filter werden in der in Abb. 1 geschilderten Weise durchgeschnitten, wobei der mittlere Teil, dessen Größe der der Siebplatte entspricht, frei bleibt.

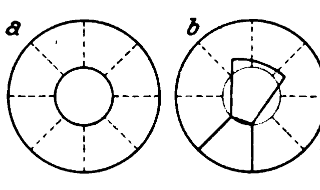


Abb. 1.

Das Filter *a* wird nun fest an Trichterwand und Siebplatte angelegt, indem man in der in Abb. 1 angedeuteten Weise faltet; man befeuchtet dann das Filter mit destilliertem Wasser und saugt an der Wasserstrahlpumpe scharf ab, nachdem man das Filter an einer Saugflasche oder besser einem Saugreagenzglas angebracht hat. Dann bedeckt man in ähnlicher Weise das Filter *a* mit dem Filter *b*, aber so, daß die Einschnitte in den Filtern nicht übereinander kommen, sondern gegeneinander etwas verschoben sind,

legt die den Trichterrand überragenden Teile des Filters nach außen um und schmiegt sie der Glaswand fest an (eventuell unter Zuhilfenahme eines Bindfadens). Auch dieses Filter wird mit destilliertem Wasser befeuchtet, dann scharf abgesaugt, so daß die Filter nur spurweise feucht sind.

Jetzt kann an die Dichtung mit Kollodium geschritten werden. Der nach obiger Schilderung vorbereitete Trichter wird mit 4proz. Kollodium ganz voll gegossen; nach einigen Minuten gießt man das Kollodium wieder ab. Auch der Außenrand des Filters wird mit Kollodium überstrichen. Dann läßt man an der Luft trocknen. Die fertigen Trichter müssen stets in mit Toluol versetztem destillierten Wasser liegen.

Diese Anordnung hat gegen die sonst üblichen den Vorteil, daß die filtrierende Oberfläche groß und die Filtrationsgeschwindigkeit bedeutend ist. Verwendet man Absaugreagenzgläser von möglichst schmaler Form, so ist die Gefahr des Verdunstens der Flüssigkeit während des Filtrierens so gut wie ausgeschlossen. In der beschriebenen Anordnung kann man bequem von der fünffach verdünnten Milch in 5 bis 7 Minuten 2 ccm Ultrafiltrat erhalten.

Bei der Ausführung der Filtration wird das Filter zunächst auf seine Dichtigkeit geprüft, die in den ersten 15 Minuten erhaltenen Ultrafiltrate werden verworfen, da sie durch die Feuchtigkeit der Filter verdünnt sind.

Mittels dieser Anordnung wurde nun der folgende Versuch angestellt.

Frische, fünffach mit destilliertem Wasser verdünnte Milch (mit 0,1604 Proz. CaO) wurde 5 bis 7 Minuten lang ultrafiltriert und im Filtrat das CaO bestimmt.

Nr.	CaO in 1 ccm Ultrafiltrat; mg (= 0,2 ccm Milch)	CaO in Proz.
1	0,154	0,077
2	0,162	0,081
3	0,175	0,0875
4	0,141	0,0705

Dieselbe Milch wurde fünffach verdünnt, 24 Stunden stehengelassen, dann 5 bis 7 Minuten ultrafiltriert. Die Reaktion ist sauer.

Nr.	CaO in 1 ccm Ultrafiltrat; mg (= 0,2 ccm Milch)	CaO in Proz.
1	0,319	0,1595
2	0,314	0,1570

Diese Versuche zeigen, daß in der frischen Milch etwa 50 Proz. des gesamten Ca in kolloidaler Form zugegen sind. Wird die Milch sauer, so wird die Gesamtmenge des Ca ultrafiltrierbar.

B[1]). Noch bequemer als mit der vorher beschriebenen kommt man mit der folgenden Methode zum Ziele.

[1]) Die folgende Anordnung, deren Publikation sich aus äußeren Gründen verzögert hat, ist von mir vor Veröffentlichung und ohne Kenntnis der von *Giemsa*, diese Zeitschr. **182**, 488, angegebenen Ultrafiltrationsmethode ausgearbeitet worden. Sie enthält nur unwesentliche Abweichungen von der Anordnung von *Giemsa*, dem das Verdienst, zuerst zylindrische Tauchfilter für die Ultrafiltration vorgeschlagen zu haben, zukommt. Da die oben beschriebene Methode aber auch einige Vorteile haben dürfte, sei sie ausführlicher mitgeteilt.

Der wesentliche Bestandteil der Anordnung ist ein Sieb von einer Länge von etwa 28 cm (aus Glas, Porzellan oder Aluminium) (s. Abb. 2). Oben in einer Breite von 3 cm und unten über dem festen Boden in einer Breite von 1 cm sind keine Löcher angebracht. Die einzelnen, etwa 1 mm großen Löcher stehen etwa 0,5 cm voneinander entfernt. Das Sieb wird oben mit einem durchlochten Gummistopfen verschlossen, in dem ein Glasrohr steckt, das zur Wasserpumpe führt.

Um dieses rohrförmige Sieb wird das Kollodiumfilter angebracht. Zu diesem Zwecke legt man zunächst unter den Boden ein rundes Filtrierpapier, dessen überstehende Ränder nach oben gefaltet werden. Dann legt man um die Wand des Siebes ein Filtrierpapier von etwa 1 mm Dicke allseitig fest herum, befeuchtet das Papier, entfernt dann alle überflüssige Feuchtigkeit und behandelt das ganze zweimal wie oben beschrieben mit 4proz. Kollodiumlösung. Die ganze Filtriervorrichtung wird nun, in ein Becherglas mit fünffach verdünnter Milch gesteckt, in Anwendung gebracht. Der Dialysator muß, wenn nicht gebraucht, stets in (mit Toluol versetztem) destilliertem Wasser aufbewahrt werden; er kann bei sachgemäßer Behandlung mindestens einen Monat lang gebraucht werden. Außen sich ansammelnde kolloidale Substanz kann man durch vorsichtiges Abwaschen mit destilliertem Wasser leicht entfernen. Man kann auch mehrere Apparate gleichzeitig an die Wasserstrahlpumpe anschließen, wie man auch die Dimensionen des einzelnen Apparates je nach Bedarf ändern kann.



Abb. 2.

Es muß darauf geachtet werden, daß die Sieblöcher nicht zu groß, ihr Abstand voneinander nicht zu klein wird. Eine gewisse Dicke des dem Kollodium als Stütze dienenden Filtrierpapiers ist von Vorteil, da dadurch das im Papier befindliche Filzwerk von Kollodium mit einer großen Oberfläche als Filtermembran wirkt.

Vor dem Gebrauch muß jedesmal mit Kongorot auf Dichtigkeit geprüft werden. Das in den ersten 10 bis 20 Minuten gewonnene Ultrafiltrat wird weggegossen.

Mit diesem „Vakuumdialysator" arbeitet man viel schneller als mit der zuerst beschriebenen Vorrichtung, so daß man in allen Fällen, bei denen man größere Mengen des Ultrafiltrats braucht, wie bei der Cl- und P-Bestimmung, sich mit Vorteil des Vakuumdialysators bedienen wird. Bei der Schnelligkeit des Filtrierens ist auch die Gefahr eines Einengens der Flüssigkeit während desselben völlig vermieden.

Mit diesen Verfahren wurde nun das Verhalten des Cl, P, des K und Ca in der Milch untersucht. Der Vakuumdialysator befand sich dabei stets in einem Becherglase, das mit fünffach verdünnter Milch gefüllt war. Die Chlorbestimmung erfolgte nach *Volhard* (5). Die Kaliumbestimmung nach *Kramer* (6). Die Phosphorbestimmung nach *Woy* (7) [nach vorheriger Veraschung nach *Neumann* (8)]. Die Calciumbestimmung nach *de Waard*.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in den folgenden Tabellen wiedergegeben.

1. Verhalten von Chlor in der Milch.

Chlorgehalt der ursprünglichen Milch		Chlorgehalt des Ultrafiltrats	
in 1 ccm mg	Proz.	in 5 ccm (= 1 ccm Milch) mg	Proz.
1,050	0,1	1,0675	0,1
1,015	0,1	1,1150	0,1
—	—	1,0780	0,1
—	—	1,0010	0,1

2. Verhalten von Kalium in der Milch.

K-Gehalt in der ursprünglichen Milch		K-Gehalt des Ultrafiltrats	
in 1 ccm mg	Proz.	in 1 ccm (= 0,2 ccm Milch mg	Proz.
1,42	0,142	0,284	0,142
1,42	0,142	0,284	0,142

3. Verhalten von Phosphor in der Milch.

Gesamt-P_2O_5 in der ursprünglichen Milch		P_2O_5-Gehalt im Ultrafiltrat	
in 5 ccm g	Proz.	in 25 ccm (= 5 ccm Milch) g	Proz.
0,0103	0,2	0,0037	0,075
0,0101	0,2	0,0037	0,075

4. Verhalten von Calcium in der Milch.

Ca-Gehalt in der ursprünglichen Milch		Ca-Gehalt des Ultrafiltrats	
in 1 ccm mg	Proz.	in 2 ccm (= 0,4 ccm Milch) mg	Proz.
1,48	0,148	0,212	0,053
1,49	0,149	0,216	0,054
—	—	0,210	0,052
—	—	0,210	0,052

Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß, während das Chlor und das Kalium in ihrer Gesamtheit in ionisierter, diffusibler Form sich in der Milch befinden, vom Calcium und von Phosphor nur ein Bruchteil im Ultrafiltrat gefunden wird, und der Rest in kolloidaler Form in der Milch vorhanden ist.

Zusammenfassung.

1. Das Calcium ist zu einem großen Teil (bis 50 Proz.) in kolloidaler, nicht diffusibler Form in der Milch vorhanden.

2. Durch Sauerwerden der Milch geht das gesamte Calcium in ionisierte Form über.

3. Auch der Phosphor ist zum größeren Teil (etwa 60 Proz.) in nicht diffusibler Form in der Milch enthalten.

4. Von K und Cl ist die gesamte Menge in diffusibler Form in der Milch zugegen.

5. Methodische Angaben werden gemacht, die ein rasches, bequemes Gewinnen von Ultrafiltraten, auch in größeren Mengen, ermöglichen.

Literatur.

1) *F. W. Zahn*, Untersuchungen über die Eiweißkörper der Milch. Pflügers Arch. **2**, 598, 1869. *Söldner*, Die Salze der Milch und ihre Beziehungen zu dem Verhalten des Caseins. Landw. Versuchsstat. **35**, 354, 1888. *E. Duclaux*, C. r. **98**, 438, 1884. *J. J. Otte de Vries* und *F. W. J. Bockhout*, Beiträge zur Kenntnis der Labgerinnung. Landw. Versuchsstat. **55**, 221, 1901. *H. Droop-Richmond*, The composition of milk. The Analyst. **26**, 310, 1901. — 2) *P. Rona* und *L. Michaelis*, diese Zeitschr. **21**, 114, 1909; vgl. auch die Mitteilung von *György*, ebendaselbst **142**, 1, 1923. — 3) Ebendaselbst **21**, 114, 1909. — 4) de *Waard*, ebendaselbst **97/98**, 186, 1919. — 5) *Volhard*, Ann. **190**, 1, 1878. — 6) *Kramer*, Journ. of biol. chem. **46**, Nr. 3, S. 467, 1921. — 7) *Woy*, Chemiker-Zeitung **21**, 441, 469, 1897. — 8) *Neumann*, Hoppe-Seylers Handb. d. physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse.

Niveauregulator für Wasserdestillation.

Von

L. Jendrassik.

(Aus dem physiologischen Institut der k. ung. Universität Budapest.)

(Eingegangen am 13. November 1923.)

Mit 1 Abbildung im Text.

In physiologischen und klinischen Laboratorien ist man recht oft genötigt, Wasser in kleinem zu destillieren. So z. B. bei Arbeiten mit überlebenden Organen, wo nur aus Glasgefäßen destilliertes Wasser verwendbar ist. So taucht dann überall die Frage auf: wie könnte man die Destillation am einfachsten so vornehmen, daß das verdampfte Wasser automatisch ersetzt werde. Eine Vorrichtung zu diesem Zwecke ist aber nur dann wirklich brauchbar, wenn die Regulierung vollständig verläßlich und eine Überfüllung oder Entleerung des Kolbens ausgeschlossen ist. In den verschiedenen Laboratorien wird diese Frage mittels verschiedener, meist häuslich konstruierter Vorrichtungen gelöst.

Die einfachste Methode der Niveauregulation ist jene, bei welcher der Destillierkolben mittels eines angelöteten Rohres mit einem anderen Gefäß (mit konstanter Wasserhöhe) verbunden ist. Dieses Gefäß ist nämlich mit einem Abflußrohr versehen, wodurch das (aus dem Kühler kommende) Wasser fortwährend entweicht. Im Gebrauch entspricht diese Einrichtung allen Anforderungen.

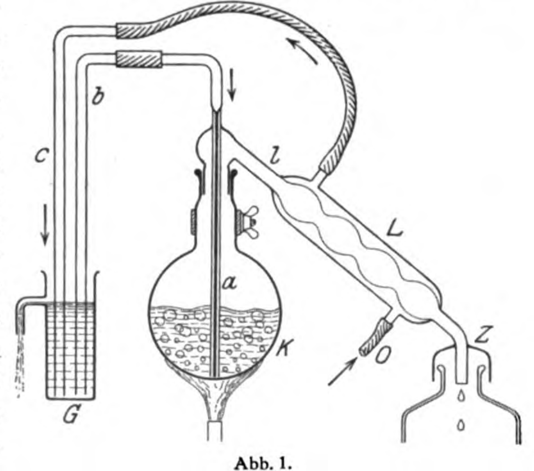


Abb. 1.

Da aber diese nicht ganz ohne Schwierigkeit herzustellen ist (man kann nicht an jedem Kolben ein Seitenstück anbringen) und außerdem ein derartig ausgerüsteter Kolben ziemlich zerbrechlich ist, sei im folgenden ein anderer, leicht herstellbarer Regulator beschrieben. Dieser hat sich im Gebrauch gut bewährt und kann auch als eine Abänderung des oben erwähnten aufgefaßt werden (s. Abbildung).

Der Inhalt des Destillierkolbens (K) ist auch hier mit einem Niveaugefäß (G) in Verbindung. Am Kolben ist aber kein Seitenrohr angebracht, und das Wasser gelangt von G in K durch das Rohr $a-b$, welches beständig Wasser enthält. Durch dieses Rohr gleicht sich die Wasserhöhe zwischen K und G ebenso aus wie durch ein Verbindungsrohr, das an der seitlichen Wand des Kolbens unter dem Wasserniveau angebracht wäre.

In diesem Apparat gelangt also das Leitungswasser durch Öffnung O zuerst in den Kugelkühler L, von dort durch c nach G. — Von hier steigt der kleinere Teil durch das Rohr $a-b$ nach K über, der größere Teil fließt aber durch das Seitenrohr in den Abzug. Der Durchmesser von b ist 7 bis 10 mm. Seine Fortsetzung a ist aber ein Kapillarrohr mit einem Lumen von 2,5 bis 3,5 mm. Es reicht ganz bis zum Boden des Kolbens. l muß ein bequemes Entweichen des Dampfes gewähren. Sein Innendurchmesser sei > 12 mm.

Für ein ungestörtes Funktionieren des Regulators ist nötig, daß Rohr $a-b$ den angegebenen Durchmesser habe. Beim Sieden des Wassers gelangen nämlich von Zeit zu Zeit Luft- und Dampfblasen in das Rohr. Hat dieses auch im oberen Teil nur Kapillarbohrung, so bleiben immer einige Bläschen in der Biegung stehen und versperren den Nachfluß. Wäre das Rohr in seiner ganzen Länge breit (wie b), so würde in seinem Innern das Wasser fortwährend ins Sieden geraten, wobei die entstandenen Dampfblasen das Wasser mit sich reißen und so den Kolben entleeren. (Der leere Kolben wird dann durch die Flamme gesprengt.) In einem breiten Rohre geraten auch von außen zu oft Dampfblasen hinein. Alle diese störenden Umstände sind vermieden, wenn der untere Teil — wie angegeben — ein Kapillarrohr und der obere Teil etwas breiter ist. So ist die Durchflußgeschwindigkeit im unteren Teil größer, darum bleibt dort die Temperatur unter dem Siedepunkt. Auch von außen kommen Bläschen in kleiner Zahl hinein und stecken nicht in der weiten Biegung.

Rohr $a-b$ wird vor Beginn der Destillation einfach durch Ansaugen am Ende des Kühlers (z) gefüllt.

Es sei noch betont, daß die gemachten Angaben nur für 1-Liter-Kolben erprobt und gültig sind. Für Kolben von größerem Inhalt könnte das Rohr a etwas zu eng (und der Nachfluß des Wassers ungenügend) sein. In den meisten Laboratorien wird aber eine Vorrichtung von dieser Größe wohl genügen. An freier Flamme erwärmt, erhalte ich etwa $^3/_4$ Liter Wasser pro Stunde.

Vor Beginn jeder Destillation ist es vorteilhaft, den Kolben mit Salzsäure zu reinigen, den eingeschliffenen Stöpsel gut einzufetten. Ist dieser aus einem anderen Glas als der Kolben, so heben wir ihn nach Beendigung der Destillation aus, sonst kann dieser bei der Abkühlung gesprengt werden. In dieser Hinsicht ist es bequemer, Kork- bzw. Gummistöpsel zu verwenden.

Über den Nachweis des Toluols in Organen und seine Verteilung im Organismus.

Von

S. Kuroda.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 16. November 1923.)

Mit 1 Abbildung im Text.

In einer vor 8 Jahren in dieser Zeitschrift erschienenen Arbeit hat *Joachimoglu*[1]) ein Verfahren beschrieben, um aus Organen von Tieren, die mit Benzol vergiftet worden waren, das Gift zu isolieren. Das Verfahren beruht darauf, daß die zerkleinerten Organe mit Wasserdämpfen destilliert werden; das Destillat wird in einer Vorlage, die Tetrachlorkohlenstoff enthält, aufgefangen und der Nitrierung unterworfen. Das Nitroprodukt läßt sich aus der wässerigen Lösung mit Äther ausschütteln; der nach Abdampfen des Äthers hinterbleibende Rückstand wird zur Wägung gebracht. Die Ausbeute beträgt etwa 60 Proz.

Dieses Verfahren hat sich inzwischen in der Praxis zur Diagnose der Benzolvergiftung als brauchbar erwiesen. *Schmitz*[2]), *Stuelp*[3]), *Gettler*[4]) berichten über Benzolvergiftungen bei Menschen, in denen es gelungen ist, den Benzolnachweis in den Organen durchzuführen und damit die Diagnose zu sichern. Es zeigte sich auch, entsprechend den Befunden in der oben erwähnten Arbeit, daß das Gehirn von dem Gifte relativ mehr aufnimmt als die übrigen Organe. So fand *Gettler* bei einem 16jährigen Jungen pro 100 g Organ in der Leber 10,1 mg, im Gehirn 19,2, im Blute 6,4 und im Herzen 2,4 mg Benzol.

Auf Veranlassung von Herrn Prof. *Joachimoglu* habe ich nun entsprechende Versuche mit Toluol ausgeführt, deren Ziel war nachzusehen, einmal, ob sich das Toluol nach einer ähnlichen Methode aus

[1]) *Joachimoglu*, diese Zeitschr. **70**, 193, 1915.

[2]) *Schmitz*, Deutsch. med. Wochenschr. 1915, Nr. 42, S. 1251.

[3]) *Stuelp*, Zeitschr. f. Medizinalbeamte 1919, Nr. 14, S. 247.

[4]) *Gettler*, Journ. of Pharm. **16**, 161, 1923.

Organen von vergifteten Tieren isolieren läßt, und dann, ob die beim Benzol gefundene Verteilung im Organismus, d. h. die Anreicherung in den Lipoiden des Zentralnervensystems sich auch hier nachweisen läßt. Was nun zunächst die Löslichkeit des Toluols in Wasser anbelangt, so haben wir sie in der Weise festzustellen versucht, daß wir abgemessene Mengen Toluol in 1000 ccm H_2O 6 Stunden lang bei Zimmertemperatur schüttelten und feststellten, welche Menge gerade noch eine vollkommen klare Lösung gibt. Es zeigt sich folgendes:

1,0 ccm in 1000 ccm Wasser nicht gelöst.
0,9 „ „ 1000 „ „ „ „
0,8 „ „ 1000 „ „ gelöst.

Es ergibt sich daraus, daß gesättigtes Toluolwasser in 1 Liter 0,8 ccm Toluol = 0,697 g Toluol enthält (spezifisches Gewicht 0,8708). Wir haben nun, um uns in quantitativer Hinsicht ein Bild zu machen über die Leistung des angewandten Verfahrens, zu 100 g Fleisch 100 ccm

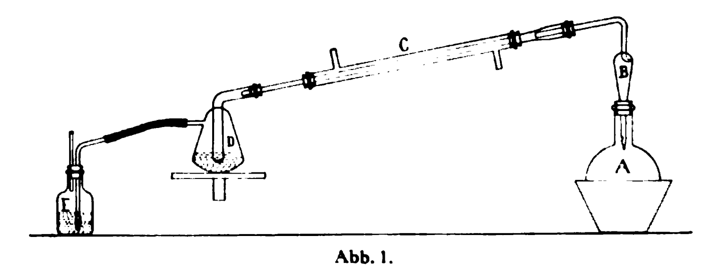


Abb. 1.

Toluolwasser mit einem Gehalt von 50 mg Toluol zugesetzt und in dem abgebildeten Apparat 45 Minuten lang destilliert. Die Anwendung eines Destillationsaufsatzes, wie früher beim Benzol, ist hier überflüssig, weil das bei 110,3° siedende Toluol in der Hauptsache mit den Wasserdämpfen in die *Stock*sche Vorlage, die 80 ccm Tetrachlorkohlenstoff enthält, übergeht; diese wurde noch mit einer Waschflasche verbunden, in die wir 50 ccm CCl_4 hineinbrachten. (Vgl. Abb. 1.) Nach Beendigung der Destillation wurde der CCl_4 in einem Scheidetrichter von dem Wasser abgetrennt und das Wasser mit dem CCl_4 der Vorlage nochmals stark geschüttelt. Wir brachten nun die ganze CCl_4-Menge in eine dickwandige Flasche mit eingeschliffenem Glasstopfen, setzten 10 ccm Nitriersäure (2 Vol. rauchende Salpetersäure und 1 Vol. konzentrierte Schwefelsäure) zu und erhitzten auf dem Wasserbade vorsichtig 45 Minuten lang. Der Inhalt der Flasche wurde dann in eine Porzellanschale gebracht und der CCl_4 auf dem Wasserbade verjagt. Der Rückstand wurde in 100 ccm Wasser aufgenommen, mit NaOH bis zur alkalischen Reaktion versetzt und in einem Scheidetrichter dreimal mit je 40 ccm Äther ausgeschüttelt. Die ätherische Lösung wurde aus

einer gewogenen Glasschale verdampft und der Rückstand zur Wägung gebracht.

Bei der Behandlung des Toluols mit Nitriersäure erhält man neben 2-, 4-Dinitrotoluol auch 2-, 5-Dinitrotoluol und 2-, 4-, 6-Trinitrotoluol[1]). 2-, 4-Dinitrotoluol gibt, in alkoholischer Lösung mit Natronlauge versetzt, eine blaue Färbung, die nicht beständig ist und bald in Dunkelbraun übergeht. In Acetonlösung[2]) erhält man mit Natronlauge eine blaugrünliche Färbung; setzt man Essigsäure zu, so geht die Farbe in Rotviolett über. Diese Farbe hält sich lange. Da man bei der Nitrierung ein Gemisch der Isomeren bekommt, und ihr Mengenverhältnis offenbar nicht immer konstant ist, so haben wir die Farbreaktionen bei der Untersuchung der aus den Organen erhaltenen Nitroprodukte nicht in allen Fällen deutlich bekommen. Bei Zusatz der oben erwähnten Toluolmengen erhielten wir folgendes Resultat:

Toluol berechnet . . . . . 50 mg
„ gefunden . . . . . 46 „

Wir haben dann eine Reihe von Tieren, und zwar Hunde und Kaninchen, mit Toluol vergiftet und dann die Organe nach dem oben geschilderten Verfahren auf Toluol untersucht. Die Tiere wurden unter eine Glasglocke (Inhalt 28 Liter, bei den Hunden betrug der Inhalt der Glocke 100 Liter) gebracht. In die obere Öffnung der Glasglocke wurde ein Wattebausch lose befestigt und mit Toluol getränkt. Auf eine quantitative Bestimmung der Toluolkonzentration wurde verzichtet. Der Verlauf der Vergiftung ist aus folgenden Protokollen ersichtlich.

Hund Nr. 1. 24. Oktober 1923. Körpergewicht 8900 g.

10h 15. Beginn der Inhalation.
10 16. Tier ist unruhig.
10 18. Tier zittert, Harnentleerung.
10 20. Speichelfluß, Seitenlage.
10 23. Mehrere Schreie, Salivation noch stärker.
10 25. Tier wird ruhig, kneift die Augen.
10 26. Ab und zu tonische Zuckungen der Glieder.
10 29. Heftigere tonische Zuckungen.
10 30. Zuckungen aufgehört. Die Glocke wird weggenommen. Das Tier atmet schwach.
10 32. Fibrilläre Zuckungen.
10 37. Das Herz schlägt unregelmäßig. Heftige tonische Krämpfe.
10 44. Atmung kurz, starke Bradykardie.
10 45. Tot.

[1]) Vgl. *Richter*, Organ. Chem. 2, 75, 1913.
[2]) *Beilstein*, Organ. Chem., 4. Aufl., 5, 340.

Sektion.

Beide Lungen hyperämisch, namentlich in den unteren Lappen. Schleimhaut der Trachea und der Bronchien mäßig gerötet. Blut dunkelrot. Die übrigen Organe ohne Befund.

Auf Toluol wurden folgende Organe untersucht:

	Dinitrotoluol gefunden		Toluol berechnet
15,7 g Rückenmark	48,0 mg	=	24,4 mg
78,0 g Gehirn	63,4 „	=	32,3 „
92,0 g Blut	51,8 „	=	26,3 „
82,3 g Lunge	104,4 „	=	53,2 „
77,4 g Leber	60,2 „	=	30,7 „
28,4 g Pankreas	77,0 „	=	39,2 „
17,6 g Milz	238,0 „	=	121,3 „
94,9 g Fettgewebe	26,0 „	=	13,2 „

Das untersuchte Fett stammt aus der Umgebung der Nieren, den Mesenterien und dem Fettgewebe in der Umgebung der Blase.

Hund Nr. 2. 30. Oktober 1923. Gewicht 3050 g.

9h 45. Beginn der Inhalation.
9 52. Tier läßt Harn, zittert.
9 54. Salivation.
9 55. Seitenlage.
9 59. Tier ist ganz ruhig.
10 03. Tier wird aus der Glocke herausgenommen.
10 06. Dyspnoe.
10 12. Tot.

Sektion.

Beide Lungen hyperämisch. Sonstige Organe ohne Befund. Blutbefund siehe Tabelle I.

Auf Toluol wurden untersucht:

	Dinitrotoluol gefunden		Toluol berechnet
9,77 g Rückenmark	12,0 mg	=	6,1 mg
39,7 g Lunge	55,8 „	=	28,4 „
45,4 g Leber	32,6 „	=	17,6 „
8,6 g Pankreas	9,0 „	=	4,9 „
7,42 g Milz	110,0 „	=	56,0 „
28,7 g Fettgewebe	33,6 „	=	17,1 „

Kaninchen Nr. 1. 22. Oktober 1923. Gewicht 2200 g.

10h 27. Beginn der Inhalation.
10 32. Tier ist unruhig.
10 34. Seitenlage. Fibrilläre Zuckungen in den Muskeln der Extremitäten.
10 43. Atemstillstand.
10 45. Exitus.

Sektion.

Atelektase der Lungen. Die übrigen Organe ohne Befund. Blut von dunkler Farbe, keine Gerinnsel.

Auf Toluol wurden untersucht:

	Dinitrotoluol gefunden		Toluol berechnet
9,2 g Gehirn	364,8 mg	=	185,9 mg
11,7 g Blut	96,2 „	=	49,0 „
15,6 g Lunge	2,8 „	=	1,4 „
68,0 g Leber	106,0 „	=	54,0 „
1,3 g Milz	75,0 „	=	38,2 „
11,9 g Fettgewebe	26,0 „	=	13,2 „

Kaninchen Nr. 2. 1. November 1923. Gewicht 1500 g.

10h05. Beginn der Inhalation.
10 12. Tier ist unruhig.
10 13. Seitenlage.
10 15. Schreie.
10 17. Zittern in den Extremitäten. Dyspnoe.
10 18. Das Tier wird aus der Glocke herausgenommen.
10 20. Fibrilläre Zuckungen.
10 21. Tonische Krämpfe.
10 24. Atemstillstand.
10 30. Tot.

Sektion.

Lungen leicht hyperämisch. Blut von dunkelroter Farbe. Sonstige Organe ohne Befund.

Auf Toluol wurden folgende Organe untersucht:

	Dinitrotoluol gefunden		Toluol berechnet
7,6 g Gehirn	39,0 mg	=	19,8 mg
3,6 g Blut	29,0 „	=	14,7 „
18,4 g Leber	18,4 „	=	9,2 „
1,0 g Milz	20,6 „	=	10,5 „

Kaninchen Nr. 3. 2. November 1923. Gewicht 2150 g.

9h45. Beginn der Inhalation.
9 50. Tier ist unruhig und schreit 2 Minuten lang. Salivation.
10 52. Parese der Hinterbeine.
10 53. Seitenlage.
10 54. Tonische Zuckungen.
10 57. Dyspnoe und fibrilläre Zuckungen.
10 00. Tier wird aus der Glocke herausgenommen.
10 03. Atemstillstand.
10 05. Exitus.

Sektion.

Blut von dunkelroter Farbe.

Auf Toluol wurden untersucht:

	Dinitrotoluol gefunden		Toluol berechnet
9,55 g Gehirn	12,4 mg	=	6,3 mg
8,00 g Blut	7,4 „	=	3,7 „
42,2 g Leber	25,8 „	=	13,0 „
0,85 g Milz	1,3 „	=	6,6 „

Die beobachteten Vergiftungserscheinungen setzen sich zusammen aus der lokalen Reizung der Schleimhäute des Auges, des Mundes usw. und aus der Wirkung des Toluols auf das Zentralnervensystem. Dabei beobachtet man in tiefer Narkose fibrilläre Zuckungen in den Muskeln, namentlich der hinteren Extremitäten. Diese Symptome sind ja auch von der Benzolvergiftung her bekannt. Bei der Sektion fällt die dunkle Färbung des Blutes auf und das Fehlen von Blutgerinnseln. Stellen wir unsere Zahlen in einer Tabelle zusammen, in der der Toluolgehalt der Organe pro 100 g berechnet ist, so ergibt sich im allgemeinen, daß das Zentralnervensystem relativ mehr Gift enthält als die übrigen Organe. Es finden sich jedoch einige Unterschiede gegenüber dem Benzol, so enthält z. B. die Milz von allen Organen die größten Toluolmengen. Bei den Versuchen an Hunden enthält auch die Lunge und das Pankreas relativ viel Toluol.

Tabelle I.

Toluol in	Hund 1	Hund 2	Kaninchen 1	Kaninchen 2	Kaninchen 3
100 g Rückenmark . .	115,8	62,6	—	—	—
100 g Gehirn	41,1	—	2020,6	261,3	66,1
100 g Blut mit Herzen .	28,5	—	418,8	410,6	47,1
100 g Lunge	64,6	71,6	9,1	—	—
100 g Leber	39,6	38,3	79,4	50,9	30,9
100 g Pankreas	138,0	53,3	—	—	—
100 g Milz	687,4	755,6	2938,4	1049,8	779,5
100 g Fettgewebe . . .	13,9	59,6	11,4	—	—

Bei den früheren Versuchen mit Benzol hat *Joachimoglu* in der Milz nur sehr geringe Mengen des Giftes gefunden, und dieser Befund stimmt mit den Untersuchungen von *Gettler* in dem oben erwähnten Falle überein. Auch *Gettler* fand in der Milz nur Spuren von Benzol. *Beim Toluol finden wir, daß die Milz mehr Toluol enthält als das Zentralnervensystem.* Dieser Befund veranlaßte uns, nachzusehen, ob die Wirkung des Toluols die Zahl der Leucocyten des Blutes beeinflußt. Wir haben ihre Zahl vor und nach der Vergiftung bestimmt. Die Zahlen sind aus folgender Tabelle ersichtlich.

Die Tabelle II zeigt uns, daß die Leucocytenzahl ziemlich stark abnimmt. In einem einzigen Falle haben wir nach der Inhalation eine Hyperleucocytose (vgl. Versuch Nr. 7, Tabelle II) beobachtet. Es unterliegt keinem Zweifel, daß die Anreicherung des Toluols in der Milz mit dieser Wirkung auf das Blut in Zusammenhang zu bringen ist. Wir behalten uns vor, in dieser Richtung noch weitere Versuche anzustellen.

Tabelle II.

Nr. des Versuchs	Datum 1923	Tierart	Gewicht in g	Leucocytenzahl vor der Inhalation	Blutentnahme nach Beginn der Inhalation in Minuten	nach Beginn der Narkose*) in Minuten	Leucocytenzahl nach der Inhalation	Setzt man die Zahl der Leucocyten vor der Inhalation = 100, so beträgt sie nach der Inhalation	Grad der Vergiftung
1	30. X.	Hund 2	3050	40 470	25	15	9 370	26	Tödliche Vergiftung
2	1. XI.	Kaninchen 2	1500	17 200	16	8	15 400	89	Tödliche Vergiftung
3	2. XI.	„ 3	2150	12 500	17	9	8 400	67	Tödliche Vergiftung
4	1. XI.	„ 4	3150	18 900	27	9	9 840	52	Narkose
5	2. XI.	„ 4	3200	30 100	55	29	29 600	98	„
6	3. XI.	„ 4	3160	18 700	28	3	16 900	90	„
7	5. XI.	„ 4	3100	19 500	40	18	77 200	396	„
8	6. XI.	„ 4	3150	14 900	64	9	10 500	70	„
9	5. XI.	„ 5	950	36 100	26	7	17 500	48	„
10	6. XI.	„ 5	940	42 900	31	10	31 640	73	Tiefe Narkose, nach 2 Tagen tot
11	5. XI.	„ 6	1000	24 000	24	8	11 300	47	Narkose
12	6. XI.	„ 6	970	23 800	58	7	12 100	51	„

*) d. h. Tier liegt in Seitenlage.

Zusammenfassung.

1. Es wird ein Verfahren beschrieben, um aus Organen von Tieren, die mit Toluol vergiftet worden sind, das Gift quantitativ zu bestimmen.

2. Das Zentralnervensystem enthält mit Ausnahme der Milz mehr Toluol als die übrigen Organe.

3. Die Zahl der Leucocyten nimmt durch die Vergiftung mit Toluol ab.

Verfahren zur Reinigung von Toxinen, Fermenten und anderen biologisch wirksamen organischen Kolloiden.

Von

Leonor Michaelis und **Heinrich Davidsohn**.

(Eingegangen am 17. November 1923.)

In einer kürzlich in dieser Zeitschrift erschienenen Arbeit hat *v. Gröer*[1]) zeigen können, daß im Diphtherietoxin durch passenden Säurezusatz ein Niederschlag erzeugt wird, der unter Umständen die Gesamtmenge der toxischen Substanz enthält. Die Arbeit *v. Gröers* gibt uns Veranlassung zur Mitteilung bisher nicht veröffentlichter älterer Untersuchungen, die sich unter anderem mit demselben Problem beschäftigt, aber darüber hinaus zur Ausarbeitung eines Verfahrens für die Reinigung biologisch wirksamer organischer Kolloide geführt haben.

Ausgehend von den Bestimmungen des isoelektrischen Punktes am Albumin von *Michaelis* und *Rona*[2]) und am Pepsin von *Michaelis* und *Davidsohn*[3]) hatten wir 1910 den isoelektrischen Punkt des Trypsins und das Flockungsoptimum seiner Lösungen studiert[4]). Es ergaben sich bei diesen Untersuchungen Beobachtungen, die den Gedanken nahelegten, daß durch Verwendung des Flockungsoptimums eine Reinigung biologisch wirksamer organischer Kolloide möglich sein müßte. Bezüglich des Trypsins konnte nämlich folgendes festgestellt werden: Isoelektrische Konstante des Trypsins und Koagulationsoptimum des aus Pankreasextrakten fällbaren α-Nucleoproteids liegen praktisch bei derselben Wasserstoffionenkonzentration. Das im Flockungsoptimum ausgefällte α-Nucleoproteid schließt beinahe das gesamte Trypsin der Lösung in sich ein. Die dem Koagulationsoptimum des α-Nucleoproteids entsprechende Wasserstoffionenkonzentration ist verschieden von derjenigen, die das Flockungsoptimum des β-Nucleoproteids der

---

[1]) Diese Zeitschr. **138**, 13, 1923.
[2]) Ebendaselbst **27**, 38, 1910.
[3]) Ebendaselbst **16**, 486, 1909.
[4]) *L. Michaelis* und *H. Davidsohn*, ebendaselbst **30**, 481, 1911.

Pankreasextrakte und des bei seiner Darstellung abgespaltenen Eiweißkörpers charakterisieren. Bei Versuchen mit den Extrakten verschiedener anderer Organe konnte kein anderes Fällungsoptimum im Umkreise derjenigen Wasserstoffionenkonzentration gefunden werden, die dem Koagulationsoptimum des α-Nucleoproteids der Pankreasextrakte entspricht. Dieses Koagulationsoptimum ist deshalb als ein für das Pankreas durchaus charakteristischer Befund angesprochen und die Ausfällung des α-Nucleoproteids im isoelektrischen Punkt gleichsam als Reindarstellung des Trypsins bezeichnet worden.

Auf diese experimentellen Befunde gestützt, haben wir in den folgenden beiden Jahren umfangreiche Untersuchungen über die Reinigung biologisch wirksamer organischer Kolloide angestellt. Daß sich unter Umständen beim Studium der Flockungsoptima verschiedener Extrakte und Lösungen störende Interferenzerscheinungen zeigen können, ist in einer späteren Arbeit besprochen worden[1]. Trotzdem haben die erwähnten Untersuchungen so befriedigende Resultate ergeben, daß 1912 ein Verfahren zur Reinigung von Toxinen, Fermenten und anderen biologisch wirksamen organischen Kolloiden zum Patent angemeldet wurde. Da sich die Durchführung des Patentanspruchs bis in die Kriegsjahre hinzog und damals das Interesse für diese Fragen begreiflicherweise gering war, ist im Kriege auf seine weitere Fortführung verzichtet worden und eine Veröffentlichung der damaligen Untersuchungen unterblieben. Wenn die Gelegenheit zur Mitteilung des vorher angedeuteten Verfahrens jetzt nicht ungenutzt gelassen wird, so geschieht es aus der Überlegung, daß dieses Verfahren anderen beim Studium biologischer Fragen von Nutzen sein könnte. Eine ausführliche Mitteilung der Versuchsresultate erscheint aber nicht mehr zweckmäßig. Es soll vielmehr in folgendem nur die 1912 eingereichte Patentschrift unverändert wiedergegeben werden.

Verfahren zur Reinigung von Toxinen, Fermenten und anderen biologisch wirksamen organischen Kolloiden.

Viele biologisch oder medizinisch wirksame Substanzen, welche nicht kristallisierungsfähig sind, können nicht in reinem Zustande, sondern nur vermengt mit anderen, mehr oder minder unerwünschten Beimengungen gewonnen werden. So enthält z. B. das gewöhnliche *Koch*sche Alt-Tuberkulin stets die Peptone der Nährbouillon, auf dem die Tuberkelbazillen gezüchtet worden sind, oder es enthalten die Trypsinpräparate in der Regel außer dem eigentlichen Ferment noch andere proteinartige Bestandteile der Pankreasdrüse, aus denen sie gewonnen worden sind. Das von uns zum Patent angemeldete Verfahren soll die Aufgabe erfüllen, diese wirksamen kolloidalen Substanzen von den unerwünschten Beimengungen zu trennen.

[1] *L. Michaelis* und *H. Davidsohn*, diese Zeitschr. **39**, 496, 1912.

Das Verfahren beruht auf der Tatsache, daß viele kolloidale Stoffe aus ihren Lösungen dadurch gefällt werden können, daß man diese Lösung auf eine ganz bestimmte, für jedes Kolloid charakteristische Wasserstoffionenkonzentration bringt. Dies wird dadurch bewerkstelligt, daß man der möglichst elektrolytarmen, nötigenfalls durch Dialyse elektrolytarm gemachten Ausgangslösung des betreffenden Stoffes eine schwache Säure und gleichzeitig ein Alkalisalz derselben Säure in einem ganz bestimmten Mengenverhältnis von Säure zu Salz, bzw. in anderen Fällen eine schwache Base nebst ihrem Chlorhydrat in einem bestimmten Mengenverhältnis von Base zu Salz ansetzt. Die zur Ausfällung erforderlichen Mengen von Säure und Salz sind durchweg sehr gering, und es hat daher dieses Verfahren mit der sogenannten Aussalzung von Kolloiden nichts gemein.

Das Verfahren beruht auf der von *Michaelis* und *Rona* in dieser Zeitschrift **27**, 38 beschriebenen Tatsache, daß denaturiertes Serumalbumin bei einer ganz bestimmten Wasserstoffionenkonzentration ein Flockungsoptimum hat. Während aber in dieser Mitteilung nur mit reinen Albuminlösungen gearbeitet wurde, liegt unserem Patentanspruch die Beobachtung zugrunde, daß eine derartige Erscheinung auch bei anderen Kolloiden vorkommt. und daß vor allem auch aus Gemischen von Kolloiden ein einzelnes, biologisch wirksames Kolloid durch das gleiche Verfahren isoliert abgeschieden werden kann. Es wird daher mit Hilfe einer im Prinzip, und zwar von uns schon publizierten Methode durch Anwendung auf neue Objekte ein neues unerwartetes Resultat hervorgebracht, nämlich die Reinigung biologisch wirksamer Substanzen. Die für jedes einzelne Kolloid geeignetste Wasserstoffionenkonzentration wird durch einen Vorversuch im kleinen ermittelt, welcher nach Analogie der Anordnung in der zitierten Arbeit ausgeführt wird.

Beispiel für die Reinigung eines Toxins.

Die Rohlösung des Diphtherietoxins, d. h. das bakterienfreie Filtrat einer Bouillonkultur von Diphtheriebazillen, wird in einer Menge von 10 ccm mit 10 ccm n/2 milchsaurem Natron und 1 ccm n Milchsäure, sowie 9 ccm Wasser versetzt. Es entsteht ein feinflockiger Niederschlag, welcher bald abzentrifugiert werden kann. Derselbe enthält einen wesentlichen Anteil des vorhandenen Toxins, aber so gut wie nichts von den Peptonen der Bouillon.

Beispiel für die Reinigung eines Ferments.

Ausgangsmaterial sei irgend ein Trypsinpräparat des Handels, z. B. Trypsinum purissimum Rhenania. Man versetzt 100 ccm einer 2 proz. filtrierten Lösung dieses Präparates in destilliertem Wasser mit 10 ccm n/10 milchsaurem Natron und 10 ccm n/10 Milchsäure. Es entsteht ein Niederschlag. den man am nächsten Tage abzentrifugiert. Derselbe enthält den größten Teil des vorhandenen Trypsins, dagegen nur verschwindend wenig von den sonst vorhandenen eiweiß- und albumoseartigen Körpern.

Zwei Beispiele für die Reinigung anderer biologisch wirksamer Kolloide.

1. Reinigung des Tuberkulins.

20 ccm des käuflichen Alt-Tuberkulins werden mit 166 ccm Wasser, 14 ccm m/1 Weinsäure und 20 ccm m/10 weinsaurem Natron versetzt. Es

entsteht ein Niederschlag, welcher bald abzentrifugiert werden kann. Er enthält einen erheblichen Teil des wirksamen Tuberkulins, aber nicht die Peptone des käuflichen Alt-Tuberkulins.

2. Gewinnung der agglutinogenen Substanz des Typhusbazillus.

Aus 24stündigen Agarkulturen des Typhusbazillus wird eine mäßig dichte Aufschwemmung in destilliertem Wasser hergestellt, nach 3 Wochen werden die Bazillen scharf abzentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit in einer Menge von 100 ccm mit 10 ccm n/10 essigsaurem Natron und 20 ccm n/10 Essigsäure versetzt. Es entsteht ein Niederschlag, welcher nach 2 Stunden abzentrifugiert werden kann. Dieser Niederschlag, in spurweise alkalisch gemachtem Wasser zur Lösung gebracht, wird durch Typhusagglutininserum agglutiniert. Er stellt somit eine spezifisch wirksame Substanz der Typhusbazillen dar.

Der Patentanspruch erstreckt sich demnach auf ein Verfahren zur Reinigung von Fermenten, Toxinen und anderen biologisch wirksamen Kolloiden, darin bestehend, daß die auf die übliche Weise bisher erhältlichen Lösungen dieser Stoffe durch Zusatz geringer Mengen einer Säure und gleichzeitig ihres Alkalisalzes in einem ganz bestimmten Mengenverhältnis von Säure zu Salz, welches durch einen Vorversuch ermittelt wird, ausgefällt werden.

Zur Kenntnis der Auxoureasen.

Von

Franco di Renzo aus Palermo.

(Aus dem biochemischen Laboratorium des Krankenhauses Moabit in Berlin.)

(Eingegangen am 19. November 1923.)

Auf dem großen Gebiete der Fermentforschung gibt es wohl keine Stelle, an der Substanzen von bekannter chemischer Konstitution so maßgebend an der eigentlichen Leistung des Enzyms beteiligt sind, wie bei den von *Jacoby* und seinen Mitarbeitern entdeckten Auxokörpern der Ureasen. Wenn *Jacoby* auch mit Recht sich bisher stets zurückhaltend über den Mechanismus der Auxowirkung ausgesprochen hat, lag es doch nahe anzunehmen, daß auch in der Natur derartige Stoffe die Enzyme begleiten oder vielleicht integrierende Bestandteile des Enzymkomplexes sind. In der Tat haben bereits *Jacoby* und *Sugga*[1]) ihre Versuche in dem Sinne gedeutet, daß sich vielleicht neben der Soja-Urease Substanzen finden, „die sich wie die als Auxosubstanzen der Urease von *Jacoby* und *Umeda*[2]) erkannten Aminosäuren verhalten". *Onodera* hat dann ein Coenzym der Urease angenommen, *Kato* hat sich ähnlich wie *Jacoby* und *Sugga* geäußert.

Für diese Fragen sind Versuche interessant geworden, die ich auf Anregung von Herrn Prof. *Martin Jacoby* ausgeführt habe. Es sollte untersucht werden, ob Lösungen der Urease durch Vorwärmen physikalisch oder chemisch so verändert werden, daß sie beim Zusammenbringen mit dem Substrat nach wieder erfolgter Abkühlung mehr oder weniger wirksam sind. Bereits a priori war zu hoffen, daß derartige Untersuchungen auf die Funktion der Auxostoffe einiges Licht werfen würden. Diese Erwartung hat sich auch erfüllt.

---

[1]) Diese Zeitschr. **69**, 116, 1915.

[2]) Ebendaselbst **68**, 23, 1915; vgl. auch *Jacoby* und *Umeda*, Berl. klin. Wochenschr. Nr. 30, 1914, nach einem Vortrage in der physiol. Gesellschaft zu Berlin am 26. Juni 1914.

Methodik.

Alle Versuche dieser Arbeit wurden mit einem außerordentlich wirksamen amerikanischen Jackbohnenpräparat (Arlco) angestellt, das auch bei den im hiesigen Laboratorium ausgeführten Versuchen von *Takahata* sich bewährt hatte. Herr Professor *Jacoby* verdankt das ausgezeichnete Präparat der liebenswürdigen Vermittlung von Herrn Professor *Guggenheimer*. Da nicht von vornherein vorausgesagt werden konnte, inwiefern Pufferung der Lösung die zu prüfenden Temperaturwirkungen beeinflussen und besonders verdecken könnte, wurden Versuche mit und ohne Pufferung angestellt. Einzelheiten berichten wir nachher. Die Temperaturen wurden in der Art hergestellt, daß die Fermentlösung in ein mit Wasser gefülltes Becherglas eingetaucht wurde, deren Temperatur vorher auf den gewünschten Grad gebracht wurde. Die Fermentlösung blieb dann immer für 10 bzw. 30 Minuten — das wird im einzelnen angegeben — nachdem die Versuchstemperatur erreicht war, unter ständiger Temperaturkontrolle im Wasserbade. Dann wurde sie 20 Minuten in Eiswasser gebracht und dann erst zum Versuch verwandt. Die allgemeine Anordnung der Versuche war die gleiche wie die, die seit Jahren im hiesigen Laboratorium bei Ureaseversuchen angewandt wird. Für jede Probe kamen 10 ccm Fermentlösung zur Verwendung, die Gemische kamen immer für etwa 20 Stunden in den Brutschrank.

Zunächst stellen wir in einer Tabelle Versuche zusammen, die ohne Pufferung angestellt wurden.

Tabelle I.

Erwärmungsdauer 10 Minuten. Konzentration der Fermentlösung 0,3 Proz.

Nr.	Absolute Werte					In Proz. des zugesetzten Harnstoffs				
	Zimmertemp.	60°	70°	75°	80°	Zimmertemp.	60°	70°	75°	80°
1	21,20	36,00	**48,00**	24,60	—	15,9	27,1	**36,1**	18,5	—
2	22,0	28,40	**31,80**	24,30	—	16,5	21,3	**23,9**	18,3	—
3[1])	40,80	**59,60**	50,90	46,30	35,80	30,7	**44,8**	38,3	34,8	26,9
4	31,30	31,30	**50,50**	36,20	12,20	23,5	23,5	**37,8**	27,2	9,2
5	30,70	31,30	**36,40**	—	—	23,1	23,5	**27,3**	—	—
6	10,30	13,80	**28,30**	—	—	7,9	15,2	**21,8**	—	—

Wie aus der Tabelle ohne weiteres hervorgeht, fehlte niemals ein steigernder Wärmeeffekt. Da wir von 60 bis 70° einen ziemlichen Temperatursprung vorgenommen haben, so können wir nicht den optimalen Punkt angeben, der wahrscheinlich zwischen 60 und 70° liegt. Der Übersicht wegen haben wir den maximal erreichten Wert fett gedruckt. Über 70° nimmt der Effekt ab. Aber erst allmählich werden Werte erhalten, die unter dem Zimmertemperaturwert liegen.

Offenbar ist die Konzentration von 0,3 Proz. eine sehr geeignete zur Erzielung eines deutlichen Effektes. Wenigstens nahm bei Verminderung der Konzentration der Effekt deutlich ab.

[1]) Versuchsdauer 48 Stunden.

Es wurde erhalten bei:

	Zimmertemp.	60°	70°
0,15 Proz.	13,00	14,20	15,40
0,1 „	5,00	—	4,00

Bei 30 Minuten Erwärmung wurden folgende Werte erhalten bei:

	Zimmertemp.	60°	70°
0,3 Proz.	27,60	55,00	4,80
0,3 „	10,30	28,70	27,40
0,15 „	12,40	18,80	11,60

Es zeigt sich also, was sehr begreiflich ist, daß längere Einwirkung der erhöhten Temperatur den Effekt schon bei weniger gesteigerter Temperatur deutlich werden läßt. Auch hier ist die Konzentration der Ureaselösung von Bedeutung.

Der steigernde Wärmeeffekt macht sich auch geltend, wenn die Versuche bei Phosphatpufferung und bei Innehaltung von p_H 7 angestellt werden. Es wurde so vorgegangen, daß alle Lösungen anstatt in Wasser in m/15 *Sörensen*scher Phosphatmischung hergestellt wurden.

Tabelle II.

Erwärmungsdauer 10 Minuten. Pufferkonzentration m/15 p_H 7.

Ferment-Konzentrat.	Absolute Werte					In Proz. des zugesetzten Harnstoffs				
Proz.	Zimmertemp.	60°	65°	70°	80°	Zimmertemp.	60°	65°	70°	80°
0,3	126,6	—	—	129,5	105,3	95,9	—	—	97,4	76,7
0,1	79,70	84,60	—	31,00	—	61,3	65,1	—	23,4	—
0,1	46,1	57,5	—	50,1	24,4	34,7	48,2	—	37,3	18,3
0,1	39,0	—	50,4	—	—	29,3	—	37,9	—	—
0,05	15,3	6,8	—	16,4	—	11,5	5,1	—	12,8	—
0,05	8,0	11,0	—	11,7	—	6,0	8,3	—	8,8	—

Da unter diesen Versuchsbedingungen die Ureasewirkung viel stärker ist, muß man zur Verdeutlichung des Effektes in der Fermentkonzentration heruntergehen. Das ist auch möglich, da unter dem Phosphatschutz auch bei geringerer Fermentkonzentration noch der Wärmeeffekt vorhanden ist. Wenn auch die einzelnen Versuche sich untereinander unterscheiden, sind doch die Ausschläge überall deutlich.

Es folgen nun Versuche, bei denen Cyankalium als Auxosubstanz zugefügt wurde, und zwar immer 2 ccm zu jeder Probe, die Konzentration der zugefügten Lösung ergibt sich in jedem Falle aus der Tabelle III. In diesen Versuchen entspricht 133 = 100 Proz. Harnstoff.

Tabelle III.

Erwärmungsdauer 10 Minuten.

Konzentration		Zimmertemperatur	60°	70°	80°
des Ferments Proz.	des Cyankaliums Proz.				
0,3	1	131,60	131,70	132,20	132,70
0,3	0,1	130,80	130,20	130,40	103,45
0,1	1	130,60	130,50	130,60	79,40
0,1	1	115,50	—	102,20	24,30

Diese Versuche bestätigen zunächst nur die von *Jacoby* und seinen Schülern schon so häufig sichergestellte Tatsache der Auxowirkung des Cyankaliums. Für die Frage, wie der Wärmeeffekt erklärbar ist, sind sie nicht ohne weiteres verwertbar, da die gewählten Enzymdosen zu groß waren. Später bringen wir noch Versuche, welche diese Fragen aufklären.

Einige Versuche wurden auch mit Ferment angestellt, das mit Sublimat behandelt worden war. Und zwar wurde vor dem Erwärmen je 1 ccm Sublimat (1 : 10 000) zu 10 ccm Ferment (0,3 Proz.) hinzugefügt. Das Cyankalium wurde erst später nach Erwärmung und Abkühlung zugesetzt, und zwar im Versuch 1 und 2 2 ccm einer 1proz., im Versuch 3 2 ccm einer 0,1proz. Lösung.

Tabelle IV.

Erwärmungsdauer 10 Minuten.

Nr.	Zimmertemperatur	70°	80°
1	131,20	132,00	3,30
2	131,20	130,50	3,40
3	131,10	129,50	2,90

Aus diesen Versuchen, die nur der Anfang einer noch weiterzuführenden Versuchsreihe sind, kann nur gefolgert werden, daß das auf 80° erhitzte Sublimatenzym nicht mehr durch Cyankalium reaktivierbar ist.

Die Tabelle V wird nun zeigen, daß der Wärmeeffekt in derselben Richtung wie die Auxowirkung des Cyankaliums und des Glykokolls sich geltend macht. Diese Versuche wurden alle bei Phosphatpufferung m/15 und p_H 7 ausgeführt. Vom Auxokörper kamen immer auf jede Probe 2 ccm. Auch diese Lösungen waren in bezug auf Phosphatmischung wie alle Lösungen der Versuche m/15.

Tabelle V.

Nummer	Fermentkonzentration Proz.	Auxokörperkonzentration	Zimmertemp.		60°		65°		70°		80°	
			ohne	mit	ohne	mit	ohne	mit	ohne	mit	ohne	mit
			Auxokörper		Auxokörper		Auxokörper		Auxokörper		Auxokörper	
1	0,3	Cyankalium 0,1 Proz.	126,6	127,9	—	—	—	—	129,5	127,7	105,3	126,9
2	0,1	0,1 „	79,70	127,30	84,60	127,00	—	—	31,00	126,80	—	—
3	0,1	0,1 „	46,1	129,0	57,5	126,2	—	—	50,1	129,1	24,4	87,4
4	0,05	0,1 „	15,3	130,2	6,8	46,8	—	—	16,4	115,6	—	—
5	0,05	0,1 „	8,0	129,9	11,0	130,9	—	—	11,7	117,1	—	—
6	0,1	Glykokoll 5 Proz.	39,0	132,0	—	—	50,4	132,0	—	—	—	—

Die Zahlen dieser Tabelle sind sehr lehrreich. Je nach der Fermentkonzentration ist die Harnstoffspaltung natürlich in den nicht vorgewärmten Proben verschieden stark. So ist bei 0,3 Proz. Fermentkonzentration (Versuch 1) die Wirkung zu stark, um bei der gegebenen Harnstoffmenge die Cyankaliumsteigerung erkennen zu lassen. In allen übrigen Versuchen (2 bis 6) ist die Auxokörperwirkung unverkennbar (Versuche 2 bis 5 Cyankalium, Versuch 6 Glykokoll). Im übrigen zeigt die Tabelle, und zwar meistens recht deutlich, den Wärmeeffekt.

Was aber das wesentliche ist, man erkennt, daß der Wärmeeffekt in gleicher Richtung wie die Auxokörper wirkt, daß also durch die Erwärmung der Auxokörpergehalt der Fermentlösung gleichsam zunimmt. So erklärt sich manche scheinbare Unstimmigkeit. In gewissen Fällen, z. B. beim Erwärmen auf 80°, aber bei Versuch 4 auch schon beim Erwärmen auf 60°, tritt eine Abschwächung der Wirkung an und für sich ein. Diese abgeschwächten Lösungen sind durch die Auxokörper verstärkbar. Wir müssen daher annehmen, daß der andere Teilfaktor des Ferments durch das Erwärmen anders beeinflußt wird als der Auxokörper. So erklärt sich z. B. im Versuch 5 bei 70° Zunahme der Wirkung ohne Zusatz von Cyankalium und Abnahme der Wirkung in Gegenwart des Auxokörpers.

Der hier zuerst beschriebene Wärmeeffekt ist also in direkte Parallele zur Auxokörperwirkung zu stellen. So gewähren diese Versuche einen guten Einblick in die biologischen Bedingungen der Auxokörperwirkung. Freilich bleibt der Prozeß, der bei der Erwärmung die Auxowirkung verstärkt, noch ungeklärt. Aber jedenfalls haben unsere Versuche wesentlich dazu beigetragen, das Zusammenarbeiten des Ferments im engeren Sinne und seines Auxokörpers zu beleuchten. In einer im hiesigen Laboratorium ausgeführten Arbeit wird Herr Dr. *Hosokawa* weiteres Material über diese Frage beibringen.

Über die Adsorption des Trypsins durch Filtrierpapier.

Von

Tsou-Hia Hsü aus Schantung, China.

(Aus dem biochemischen Laboratorium des Krankenhauses Moabit in Berlin.)

(Eingegangen am 19. November 1923.)

Effront[1]) hat gezeigt, daß verschiedene Früchte imstande sind, Pepsin zu adsorbieren. Das Adsorptionsvermögen der Früchte hängt von dem kolloidalen Zustand und in zweiter Linie von der Reaktion des Materials ab. In einer weiteren Untersuchung hat *Effront*[2]) dann darauf aufmerksam gemacht, daß Filtrierpapier imstande ist, in nicht zu unterschätzendem Maße Pepsin zu adsorbieren. Nach seinen Angaben verhalten sich verschiedene Marken Filtrierpapier nicht gleich. Marke *Laurent* adsorbiert gar nicht, *Berzelius* 10 Proz., *Schleicher & Schüll* 589 33 Proz., *H. J. M.* 100 39 Proz., *Dreverhoff* 147 50 Proz., 402 90 Proz., und 311 100 Proz. Die Adsorptionskraft hängt nicht von der Reinheit der Cellulose, sondern von der physikalischen Struktur ab. Je höher die Temperatur, desto schneller erfolgt die Adsorption. Jedoch nimmt bei höherer Temperatur die Wirksamkeit des Trypsins schnell ab. Die Reaktion ist ohne Bedeutung. Kochsalz hat einen gewissen Einfluß.

Diese Beobachtung von *Effront* hat auch für das analytische und präparative Arbeiten ein nicht unerhebliches Interesse. Es schien daher erwünscht, dieser Frage nachzugehen und die Untersuchung auch auf andere Enzyme auszudehnen. In dieser Arbeit habe ich auf Veranlassung von Herrn Prof. Dr. *Martin Jacoby* geprüft, inwieweit Trypsin von Filtrierpapier adsorbiert wird. In der Hauptsache wollte ich feststellen, ob bei der Berührung des Enzyms mit Filtrierpapier

---

[1]) *Jean Effront*, Sur l'adsorption de la pepsine par les papiers à filtrer. C. r. des séances de la soc. de biol. 87, Nr. 33, S. 1058—1059, 1923.

[2]) *Derselbe*, Sur l'adsorption de la pepsine et de l'acide chlorhydrique par les aliments. C. r. hebdom. des séances de l'acad. des sciences 175, Nr. 19, S. 799—803, 1923.

ein so erheblicher Teil des Enzyms aus der Lösung entfernt wird, daß es für Enzymdarstellungen und überhaupt für das Arbeiten mit Trypsin von Bedeutung sein könnte. Nachdem ich mir einen allgemeinen Überblick über das Phänomen verschafft hatte, habe ich noch untersucht, ob und inwieweit einzelne im Handel vorkommende Sorten von Filtrierpapier sich verschieden verhalten. Alle Versuche werden mit einem gut wirksamen „*Trypsin Merck*“ angestellt. Als Untersuchungsmethode benutzte ich immer die Caseinmethode. Immer werden 2 ccm einer 1 prom. Caseinlösung angewandt, stets dieselbe Verdünnung der Lösungen. Die Versuchsdauer war immer 1 Stunde, die Temperatur 37° C. Um zu prüfen, ob Filtrierpapier viel Enzym aus der Lösung nimmt, habe ich das Papier in kleine Stückchen geschnitten, um auf diese Weise durch Herstellung einer großen Oberfläche dem Papier eine möglichst große Angriffsfläche zu geben. Die folgenden Versuche zeigen die Anordnung:

Versuch.

10 ccm einer 1 prom. Trypsinlösung werden mit 0,2 g zerkleinertem Filtrierpapier in einer Schale für 15 Minuten zusammengebracht. Es wird mehrfach gut durchgemischt. Nach 15 Minuten wird filtriert. Nun werden Reihen von der Originallösung und von dem Filtrat angesetzt.

Verdünnung 1 : 1000	Originallösung	Filtrat	Verdünnung 1 : 10 000	Originallösung	Filtrat
1,0	—	—	1,0	—	+++
0,5	—	+	0,5	++	+++
0,2	—	++	0,2	+++	+++
0,1	—	+++	0,1	+++	+++
			Kontrolle:	+++	+++

Es bedeutet: — vollkommene Aufhellung, + Spur Trübung, +++ Trübung wie die Kontrolle.

Verdünnung 1 : 1000	Originallösung	Filtrat	Verdünnung 1 : 10 000	Originallösung	Filtrat
1,0	—	—	1,0	—	+++
0,5	—	+	0,5	+	+++
0,2	—	++	0,2	++	+++
0,1	—	+++	0,1	+++	+++
	—		Kontrolle:	+++	+++

Diese Versuche zeigen, daß bei der Berührung mit dem Filtrierpapier ein nicht ganz unbeträchtlicher Teil des Enzyms aus der Lösung entfernt wird. Während in der Originallösung fast 1,0 (1 : 10000) maximale Wirkung ausübt, ist von dem Filtrat des Papiers 1,0 (1 : 1000) notwendig, um dieselbe Wirkung auszuüben.

Es war festzustellen, ob das Enzym dem Filtrierpapier sich wieder entziehen läßt.

Versuch.

Ganz wie im vorigen Versuche wurden 0,2 g Filtrierpapier mit 10 ccm einer 1 prom. Trypsinlösung zusammengebracht. Nach 15 Minuten wurde filtriert. Während von der Originallösung 1,0 (1 : 10000) zur maximalen Wirkung genügte, war 1,0 (1 : 1000) des Papierfiltrats notwendig. Nach der Filtration wurde der Papierrückstand in 20 ccm Wasser aufgenommen, es wurde mehrfach umgerührt, nach 5 Minuten wurde filtriert. Der so erhaltene zweite Rückstand wurde nun mit 10 ccm Wasser angesetzt, dem zwei Tropfen 1 proz. Sodalösung zugefügt waren. Nach 5 Minuten, in denen umgerührt wurde, wurde wiederum filtriert. So erhalten wir erstens ein Wasserfiltrat und zweitens ein Sodafiltrat.

Verdünnung	Wasserfiltrat	Sodafiltrat
1,0	+++	+
0,5	+++	++
0,2	+++	+++
0,1	+++	+++
Kontrolle:	+++	+++

An Wasser gibt also das Filtrierpapier kein Enzym, an Soda geringe Mengen ab. In anderen Versuchen prüften wir, ob geringe Änderungen der Sodamengen Unterschiede bewirken. Jedoch zeigte sich, daß es gleich ist, ob man 2 oder 4 Tropfen Soda dem Wasser zufügt.

Durch Säure gelang es mir nicht, Trypsin aus dem Papier zu eluieren.

Versuch.

Es wurden je 10 ccm einer 1 prom. Trypsinlösung mit 0,2 g Papier 15 Minuten zusammengebracht, häufig umgerührt, dann wird filtriert. Der eine Rückstand wird in 5 ccm Wasser aufgenommen, dem 0,5 n/10 Schwefelsäure zugesetzt wurde. Der andere auch in 5 ccm Wasser + 1 ccm n/10 Schwefelsäure. Beide Proben wurden öfters umgerührt und nach 5 Minuten filtriert. Filtrat 1 wird mit 0,5 ccm n/10 Natronlauge, Filtrat 2 mit 1 ccm n/10 Natronlauge neutralisiert.

Verdünnung	Ausgangsfiltrat		Elutionsfiltrat	
	A	B	(0,5 H_2SO_4)	(1,0 H_2SO_4)
1,0	—	—	++	++
0,5	(+)	(+)	+++	+++
0,2	++	++	+++	+++
0,1	+++	+++	+++	+++
Kontrolle:	+++	+++	+++	+++

Mit Säure läßt sich kaum Trypsin aus dem Papier eluieren. Ebenso wie diese Versuche fielen Versuche mit Natriumbicarbonat aus. Auch hier wurde Trypsin kaum aus dem Filtrierpapier eluiert. Da wir mit Soda etwas Enzym in die Lösung gebracht haben, haben wir untersucht, ob es auch mit Ammoniak gelingt. Ferner haben wir Phosphat-

gemische von verschiedenen p_H herangezogen. Mit Ammoniak wurde nur sehr wenig Enzym eluiert. Mit Phosphatgemischen erhielten wir klare Resultate.

Versuche.

10 ccm einer 1 prom. Trypsinlösung werden mit 0,2 g Papier angesetzt, öfters umgerührt, nach 15 Minuten wird filtriert. Ein Rückstand wird mit 5 ccm Phosphatgemisch (p_H 7,0), ein anderer mit 5 ccm Phosphatgemisch (p_H 7,648) angesetzt, nach 5 Minuten wird abfiltriert und titriert.

Verdünnung	Originalfiltrat	Filtrat (p_H 7,0)	Filtrat (p_H 7,648)
1,0	—	—	—
0,5	(+)	(+)	(+)
0,2	++	++	++
0,1	+++	+++	+++
Kontrolle:	+++	+++	+++

10 ccm einer 1 prom. Trypsinlösung werden mit 0,2 g Papier angesetzt, öfters umgerührt, nach 15 Minuten wird filtriert. Ein Rückstand wird mit 5 ccm Phosphatgemisch (p_H 7,648), ein anderer mit 5 ccm Phosphatgemisch (p_H 6,648) angesetzt, nach 5 Minuten wird filtriert und titriert.

Verdünnung	Originallösung	Filtrat (p_H 7,648)	Filtrat (p_H 6,648)
1,0	—	—	—
0,5	(+)	(+)	++
0,2	++	++	++
0,1	+++	+++	+++
Kontrolle:	+++	+++	+++

Es gelingt also bei Anwendung von Phosphatgemischen sowohl bei neutraler wie auch bei schwach alkalischer Reaktion, Ferment zu eluieren, ein wenig sogar bei ganz schwach saurer Reaktion.

Sodann habe ich festgestellt, daß es keinen Unterschied macht, ob die Adsorption des Trypsins an Filtrierpapier bei Zimmertemperatur oder bei 37° C stattfindet, auch bekam ich dieselben Resultate, ob ich das Papier in etwas größere oder ganz kleine Stückchen zerschnitt.

Es ist außer Zweifel, daß das Filtrierpapier auch Trypsin aus der Lösung nimmt. Die bisherigen Versuche waren mit Filtrierpapier angestellt, das aus den großen Bogen, die für die Filtration im Laboratorium gebraucht werden, geschnitten war. Es war nunmehr die praktische Frage zu beantworten, wie sich die Analysen gewöhnlich verwandter Papiere im einzelnen verhalten. Ich habe eine größere Anzahl von Proben der Firmen *Schleicher & Schüll* und *Dreverhoff* untersucht. Die Resultate lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

Von *Schleicher & Schüll* die Marken: 575, 575 (gehärtetes Filter), 589, 590, 597, 598 und 602.

Von *Dreverhoff* die Marken: 82, 86, 204, 205, 206, 210, 231, 241, 251, 257, 258, 259, 261, 281, 311, 313, 331, 334, 335, 371, 381, 400, 403, 405, 407, 414, 417, 444, 495, 496 und Netzstoff.

In allen Versuchen wurde ganz nach dem gleichen Schema vorgegangen. Immer wurde frische Trypsinlösung benutzt und stets eine größere Anzahl Papiere gleichzeitig untersucht. Von den Papieren wurden genau gleiche Stücke abgemessen oder abgewogen. Die Proben wurden zerkleinert, kamen für 15 Minuten mit 10 ccm der 1 prom. Trypsinlösung zusammen. Dann wurde filtriert und die Filtrate und eine Kontrolle verglichen.

Die *Dreverhoff*schen Papiere entzogen der Trypsinlösung nur wenig Enzym. Niemals wurden 50 Proz. überschritten. Die Papiere von *Schleicher & Schüll* waren etwas wirksamer. Es wurden stets 50 Proz. Abschwächung erreicht und zum Teil überschritten. Wenn man aber bedenkt, daß wir hier Untersuchungsbedingungen gewählt haben, die bei der Praxis des Filtrierens nicht in Frage kommen, indem wir die Fermentlösung viel mehr mit dem Papier in Berührung brachten, als es beim Filtrieren geschieht, so erscheint die Gefahr, durch Filtration Trypsin zu verlieren, nicht erheblich.

Die Versuche zeigen weiter, daß das Filtrierpapier auch nicht geeignet ist, bei der Isolierung von Trypsin Dienste insofern zu leisten, als man etwa das Enzym durch das Papier adsorbieren lassen und dann auch das Adsorbat eluieren könnte. Die Ausbeute dieses Verfahrens wäre nicht lohnend. Trotzdem muß man daran denken, daß die Filtrierpapieradsorption für manche Enzym-Untersuchungen brauchbar sein könnte, und es erscheint notwendig, dieser Frage auch weiterhin Interesse entgegenzubringen.

Die spezifisch-dynamische Eiweißwirkung.

Von

Paul Liebesny.

(Aus dem physiologischen Institut der Wiener Universität.)

(Eingegangen am 19. November 1923.)

Die Untersuchung des Grundumsatzes als Funktionsprüfung des endokrinen Systems ist zu einer wichtigen klinischen Untersuchungsmethode geworden, seitdem die Methode 1. so weit ausgebaut ist, daß die Untersuchung in einem kurzen, den Kranken nicht irritierenden Versuch mit zureichender Genauigkeit möglich ist, 2. seitdem wir wissen, daß der Grundumsatz beim gesunden Menschen eine innerhalb ziemlich enger Grenzen schwankende konstante Größe ist, welche wir im voraus berechnen können, so daß wir Abweichungen von dem Normalwert nach oben oder unten fixieren können. Die Grundumsatznormalwerte können auf verschiedenem Wege errechnet werden.

Vielfach benutzten hierzu einzelne amerikanische Autoren die Normalwerte von *Du Bois* (1); dieser stützt sich bei seinen Berechnungen auf das sogenannte Oberflächengesetz, welches *Rubner* in die Worte faßte: „Beim hungernden und ruhenden Warmblütler bei ungleicher Größe ist der Energieverbrauch proportional der Oberfläche des Tieres". *Rubner* suchte den Grund für diese Proportionalität im wesentlichen darin, daß der Wärmeverlust von der Körperoberfläche im wesentlichen für die Wärmeproduktion maßgebend sei. Das trifft jedenfalls für den Kaltblütler nicht zu. *Hösslin* (2) und *Zuntz* (3) haben die Beziehung zwischen Körperoberfläche und Grundumsatz dahin gedeutet, daß der Umsatz annähernd proportional dem Volumen und der Lebensenergie der Muskeln sei, deren Masse und Entwicklung im Tierreiche mit der Körperoberfläche annähernd gleichmäßig wachse. *Magnus-Levy* (4) hat aber schon darauf hingewieeen, daß der Quadratmeter Oberfläche bei den verschiedenen Personen ungleiche Wärmemengen abgibt, und zwar bei den kleineren und leichteren Personen wesentlich mehr als bei den größeren und schwereren.

Die Oberflächenbestimmung geschah früher auf Grund der *Meeh*schen Formel $0 = k \sqrt[3]{P^2}$, wobei k eine Konstante ist, welche beim Menschen 12,3 beträgt, P ist das Körpergewicht. Die *Du Bois*sche Formel unterscheidet sich von der *Meeh*schen Formel, daß sie zur Berechnung der Oberfläche nicht bloß das Körpergewicht, sondern auch die Körperlänge heranzieht. Die letztere Formel lautet: $0 = 167.2 \sqrt{P} . \sqrt{L}$ (P = Gewicht, L = Länge). Die Abweichungen zwischen errechneter und gefundener

Körperoberfläche betragen bei der *Meeh*schen Formel durchschnittlich 16 Proz., bei der *Du Bois*schen Formel 1,5 Proz. Darauf hat vor allem auch *Pfaundler* (7) hingewiesen, der bei seinen Körpermaßstudien bei Kindern bei Berechnung der Körperoberfläche nach der *Meeh*schen Formel bis zu 20 Proz. abweichende Werte erhielt. *Pfaundler* unterzog die *Meeh*sche Formel einer Kritik, deren wesentlicher Inhalt folgender ist. Die Konstante K wird nach der Formel errechnet $k = \frac{0}{\sqrt[3]{P^2}}$, wobei 0 aus direkt gewonnenen Oberflächenwerten für Menschen verschiedenen Alters und Zustandes bestimmt wurde. Nun kommt es aber bei der direkten Bestimmung der Oberfläche beim Menschen oder beim Tier darauf an, inwieweit den Einzelheiten des Oberflächenreliefs Rechnung getragen wird, bis zu welcher Grenze Details der Form, natürliche Faltungen, Einbuchtungen und Vorwölbungen Beachtung finden. *Pfaundler* lehnt es wegen der Unmöglichkeit einer exakten direkten Oberflächenmessung bei Mensch und Tier ab, mit dem Begriff „Körperoberfläche“ ebenso zu operieren, wie z. B. mit dem Begriff „Körpergewicht“, „Körperlänge“ u. dgl., sondern man müsse vielmehr sagen, daß man bei Verwendung einer bestimmten Methodik der Oberflächenbestimmung, welche Oberflächendetails bis zu einer bestimmten Größenordnung berücksichtige, zu einem vergleichsmäßigen, relativen Flächenausmaß von so und so vielen Einheiten gelange. Die Anwendung der *Meeh*schen Formel zur Berechnung des G. U. ist heute mit Recht schon verlassen. *Du Bois* fand unter Anwendung seiner Formel bei 123 gesunden Menschen im Alter von 20 bis 50 Jahren teils bei kalorimetrischen, teils bei respiratorischen Untersuchungen nur Abweichungen von $\pm$ 10 Proz. der errechneten Werte.

Benedikt (5) und seine Schule lehnen es ab, die Grundumsatznormalzahl auf die Oberfläche zu beziehen, denn sie fanden bei Männern pro Quadratmeter Körperoberfläche ein Schwanken von 693 bis 958 Cal, bei Frauen von 633 bis 958 Cal. Diese Schwankungen des auf die Körperoberfläche berechneten Grundumsatzes fanden sie auch beim Menschen von gleichem Gewicht, und zwar bei 11 Männern im Gewicht von ungefähr 80 kg Schwankungen von 693 bis 940 Cal, bei 5 anderen Männern von etwa 50 kg auch wiederum 693 bis 958 Cal. *Harris* und *Benedikt* (6) stellten für die Berechnung der Wärmeproduktion auf Grund der Untersuchungen von 136 gesunden Männern und 103 gesunden Frauen und auf Grund von sorgfältigen Berechnungen und Messungen folgende Formeln auf:

$$\text{Für Männer:} \quad W = 66{,}473 + 13{,}7516\,w + 5{,}003\,s - 6{,}755\,a.$$
$$\text{Für Frauen:} \quad W = 65{,}5096 + 9{,}563\,w + 1{,}850\,s - 4{,}676\,a.$$

(w = Gewicht in Kilogrammen, s = Körperlänge in Zentimetern, a = Alter.)

Auf Grund dieser Formeln haben *Harris* und *Benedikt* Tabellen ausgearbeitet, die den Grundumsatznormalwert leicht berechnen lassen und welche sich bei den folgenden Untersuchungen außerordentlich bewährt haben. Dies insbesondere auch für extreme Werte bei Fettleibigen; die *Benedikt*schen Tabellen sind darin den nach *Du Bois* zu berechnenden Werten überlegen, während sonst die Werte von *Du Bois* und die von *Harris* und *Benedikt* gut übereinstimmen, so daß diese Zahlen, zu welchen die genannten Autoren auf verschiedenem Wege gekommen sind, mit voller Berechtigung zur Grundlage der Berechnung der Grundumsatznormalwerte herangezogen werden können.

Jedenfalls können wir heute mit Beruhigung sagen, daß wir den wahrscheinlichen Wert für den Grundumsatz zumindest bei Erwachsenen mit großer Sicherheit errechnen können. Außerdem wissen wir sowohl auf Grund experimenteller Tierversuche, als auch auf Grund klinischer Erfahrungen, daß im wesentlichen nur direkte oder vielleicht auch indirekte endokrine Einflüsse den Grundumsatz pathologisch verändern können, so daß wir in der Lage sind, aus Abweichungen des G. U. von der Norm bestimmte Schlüsse auf eine Über- oder Unterfunktion der Schilddrüse, eventuell auch auf eine Unterfunktion der Keimdrüsen zu beziehen.

In keiner Weise so einfach wie beim Grundumsatz liegen die Verhältnisse bei der spezifisch dynamischen Eiweißwirkung, welcher, wie wir annehmen können, eine nicht unwesentliche Bedeutung in der Beurteilung und Diagnostik endokriner Störungen zukommt.

Der Einfluß von Nahrungszufuhr überhaupt auf den Lungengaswechsel wurde bereits von *Lavoisier* (8) beschrieben. Er fand beim Menschen nach Nahrungsaufnahme den Sauerstoffverbrauch gegenüber dem Nüchternzustand um etwa 30 bis 40 Proz. gesteigert. Von deutschen Autoren waren es zunächst *Bitter* und *Schmidt* (9) und *Pettenkofer* und *Voit* (10), welche auf die Steigerung des Gaswechsels nach Nahrungsaufnahme hingewiesen haben. Später fand *Speck* (11) eine Steigerung des Sauerstoffsverbrauches nach Nahrungszufuhr um 25 Proz. und *Fredericq* (12) von 40 Proz. über den Normalwert. *Speck* fand das Eintreten dieser Steigerung schon 30 Minuten nach der Nahrungsaufnahme. Von anderen Autoren seien insbesondere *Rubner*, sowie *Mehring* und *Zuntz* erwähnt, die sich in zahlreichen Arbeiten mit der Stoffwechselsteigerung nach Nahrungszufuhr beschäftigten. Es kann also heute keinem Zweifel mehr unterliegen und auch nicht der Gegenstand einer neuerlichen Untersuchung sein, daß es tatsächlich nach Nahrungszufuhr zu einer Stoffwechselsteigerung kommt. Die vorliegenden Untersuchungen werden sich insbesondere mit der Frage befassen, ob es unter Einhaltung einer bestimmten Methodik bei gesunden Menschen zu einer eindeutigen Reaktion nach Nahrungszufuhr kommt und wie sich die Wirkung der Nahrungszufuhr unter krankhafter Verschiebung der Grundbedingungen ändert.

Wichtig für unsere Fragestellung ist zunächst die Feststellung, ob die Umsatzsteigerung von der Art und Quantität der Nahrung abhängig ist. Die Art der zugeführten Nahrung ist allerdings von entschiedenem Einfluß auf die Stoffwechselsteigerung.

Nach den übereinstimmenden Angaben der meisten Autoren kommt dem Eiweiß die stärkste stoffwechselsteigernde Wirkung zu. *Magnus-Levy* (13) fand in Versuchen am Menschen nach Verfütterung von 250 bis 310 g gebratenem mageren Rindfleisch in der zweiten bis dritten Stunde eine deutliche beträchtliche Steigerung des Sauerstoffverbrauches um etwa 20 Proz., auf welcher Höhe sich dieser Wert durch einige Zeit hielt. *Rubner* (14), der die Einwirkung der Nahrungszufuhr auf den Umsatz als die *spezifisch-dynamische Wirkung* der Nahrung bezeichnete, konnte in Versuchen an Hunden zeigen, daß isodyname Mengen verschiedener Nahrungs-

stoffe in gleicher Weise zugeführt, eine ungleiche energetische Wirkung entfalten. Die Eiweißfütterung beim Hunde steigert sofort die Wärmebilanz gegenüber dem Hungertage und sinkt an dem dem Eiweißtage folgenden Hungertage wieder ab. Auch war die s.d. E.W. als eine momentane Wirkung zu erkennen, die nur mehrere Stunden anhielt.

Fettverfütterung verändert die Wärmebilanz so gut wie gar nicht. Dies zeigen sowohl die Versuche *Rubners* als auch die Versuche *Zuntz* (15), sowie Untersuchungen von *Benedikt* und *Carpenter* (16). Besonders instruktiv ist eine Beobachtung *Grafes* (17) über das Ausbleiben einer s.d.W. nach Fettverfütterung. Er ließ eine 82 kg schwere Versuchsperson in 20 Minuten vor Beginn des Respirationsversuches 400 g geschmolzene Butter mit etwa 3200 Cal trinken. Diese große Fettmenge bildete selbstverständlich einen gewaltigen Reiz auf die Peristaltik, so daß schließlich unter starken Leibschmerzen sehr große Mengen unveränderter Butter vermengt mit Sekret im Stuhl entleert wurden; trotz der starken Anregung der Darmtätigkeit kam es zu keiner Steigerung des Sauerstoffverbrauches, sondern sogar zu einem Absinken um 6 Proz.

Kohlehydrate zeigen einen nach der Art verschiedenen, aber meist stärkeren Einfluß auf die Wärmebildung als das Fett, jedoch eine viel geringere Wirkung als Eiweiß. Auch ist die Kohlehydratwirkung, wie *Johannsson* (18) und *Gigon* (19) zeigten, nicht so konstant und regelmäßig, wie die Eiweißwirkung. Nach *Grafe* ist entscheidend für eine spezifisch dynamische Wirkung der Kohlehydratzufuhr der Ernährungszustand des Menschen: bei normal und ausreichend ernährten Menschen kommt es zu einer Steigerung der Wärmebilanz nach Zuckerzufuhr, besteht hingegen ein Glykogenmangel infolge Hungers oder starker Muskelarbeit, so bleibt diese Wirkung aus. *Johannsson* erklärte seine Beobachtungen der Inkonstanz der Kohlehydratwirkung auf den Energiestoffwechsel damit, daß der zugeführte Traubenzucker von der glykogenarmen Leber mit großer Geschwindigkeit in Glykogen umgewandelt wird, wodurch er seine stoffwechselsteigernde Wirkung verliere. Die Umsatzsteigerung nach Zuckerzufuhr haben *Johannsson* und *Gigon* durch Bestimmung der Vermehrung der Kohlensäureproduktion festgelegt und fanden Steigerungen bis zu 10,1 Proz. *Durig* (20) fand bei seinen Dextrose- und Alkoholversuchen nach Zufuhr von 100 g Dextrose bei seiner gesunden und gut ernährten Versuchsperson eine Steigerung des Sauerstoffverbrauches von maximal 17 Proz. *Rubner* fand beim Hund nach Kohlehydratzufuhr eine Steigerung der Wärmebilanz von 3,5 bis 3,9 Proz.

Wenn nun *Magnus-Levy* angibt, daß die durchschnittliche Steigerung des Stoffwechsels nach Zufuhr von Fett etwa 2,5 Proz. der totalen Verbrennungswärme desselben beträgt, von Stärke etwa 9 Proz., von Fleisch etwa 17 Proz, so sind dies Zahlen, die sich mit den Ergebnissen der Versuche der meisten anderen Autoren decken.

Die spezifisch-dynamische Wirkung des Eiweißes überragt demgemäß die aller anderen Nährstoffe und ist, wie auch aus den folgenden Versuchen hervorgeht, bei normalen Individuen konstant. Es haben selbstverständlich alle Untersucher danach gestrebt, eine Erklärung für die s.d.E.W. zu finden.

Zuntz und seine Schule führten die Steigerung der Stoffwechselvorgänge nach Nahrungszufuhr auf vermehrte Tätigkeit der Verdauungs- und Drüsenarbeit zurück und wiesen insbesondere darauf hin, daß intravenös gegebene Nahrungsstoffe eine viel geringere oder gar keine stoffwechsel-

steigernde Wirkung haben. Diese Ansicht von *Zuntz* fand auch in den Versuchen *Löwys* (21) über den Einfluß salinischer Abführmittel auf den Stoffwechsel eine Stütze. *Löwy* fand nämlich eine Steigerung des Stoffwechsels nach Zufuhr derartiger Abführmittel. Später nahm *Zuntz* auch eine vermehrte Nierenarbeit als Ursache der s.d.W. an. *Rubner* hingegen vertrat die Ansicht, der sich *Zuntz* und alle anderen Autoren schließlich angeschlossen haben, daß bei der Wirkung der Nahrungsmittel auf den Stoffwechsel nicht nur die Verdauungsdrüsen in Betracht kommen, sondern daß eine allgemeine zelluläre Wirkung vorliegt. Die Versuche *Löwys* mit den salinischen Abführmitteln, welche heute noch oft zu Unrecht bei der Wirkung mancher Heilbäder (Marienbad) auf die Entfettung als experimentelle Grundlage zitiert werden, wurden von *Benedikt* und *Emmes* (22) nachgeprüft. Diese Autoren konnten die von *Löwy* gefundenen Stoffwechselsteigerungen nicht finden. Auch nach Zufuhr größerer Mengen von Agar-Agar blieb diese Wirkung aus. Ferner zeigt auch der früher zitierte Versuch *Grafes*, bei dem es nach Verfütterung von 400 g geschmolzener Butter trotz einer gewaltig einsetzenden Darmperistaltik zu keiner Umsatzsteigerung kam, daß die vermehrte Darmtätigkeit für die s.d.W. der Nahrungszufuhr nicht in Frage kommt. Auch die gesteigerte Nierentätigkeit kann zur Erklärung der s.d.W. nicht herangezogen werden, da aus den Versuchen von *Tangel* (23) und seinen Mitarbeitern hervorgeht, daß bei kurarisierten Tieren nach Exstirpation beider Nieren intravenöse Injektion von Eiweiß oder Harnstoff zu einer Stoffwechselsteigerung führt. *Rubners* Auffassung, daß bei der s.d.W. besondere Einflüsse auf das Zellprotoplasma vorliegen, kann daher heute wohl als unbestritten gelten. Die besonders deutliche und konstante spezifisch-dynamische Wirkung des Eiweißes und die geringe Wirkung von Fetten und Kohlehydraten führten *Grafe* zu der Ansicht, daß das Vorhandensein der NH_2-Gruppe, welche Fetten und Kohlehydraten abgeht, für die s.d.W. bedeutungsvoll ist, und veranlaßte ihn, den Einfluß verschiedener Aminosäuren bzw. Amine und ferner verschiedener Ammoniaksalze auf den respiratorischen Gaswechsel zu prüfen. Vor *Grafe* hat auch *Lusk* (24) den Einfluß von Aminosäuren auf den Stoffwechsel geprüft. Aus letzteren Versuchen geht hervor, daß die verschiedenen geprüften Aminosäuren den Stoffwechsel in verschiedenem Grade steigern, am stärksten das Glykokoll, am schwächsten die Glutaminsäure. Der Frage, warum die einzelnen Aminosäuren verschiedene Stoffwechselsteigerung entfalten, ist *Grafe* (17) nähergetreten, indem er folgende Fragestellung formulierte: „Welche Bedeutung hat die NH_2-Gruppe im Eiweißmolekül für das Zustandekommen der s.d.E.W. und welche Rolle spielen demgegenüber die N-freien Komplexe?“ Zur Beantwortung dieser Fragen wurden von *Grafe* zunächst Untersuchungen über die Wirkung von Ammoniaksalzen und Harnstoff auf den Stoffwechsel angestellt. Der Einfluß von oral verabreichten Ammoniaksalzen wurde in zwei Versuchen am Menschen geprüft. Im ersten Versuch wurde eine verdünnte Lösung von Ammoniak mit verdünnter Salzsäure gegen Phenolphthalein neutralisiert und in $^3/_4$ Liter Wasser verteilt gegeben. Die Lösung enthielt 1,087 g N und wurde in mehreren Portionen binnen $1\frac{1}{2}$ Stunden getrunken. Dabei kam es zu einer deutlichen Steigerung des Stoffwechsels, welche in den ersten Versuchsstunden 8 Proz., in den späteren 14 Proz., gemessen am Sauerstoffverbrauch, betrug. Beim zweiten Versuch, bei welchem die Versuchsperson in $1\frac{1}{2}$ Stunden 12 g NH_4Cl mit 3,1 g N in zitronensaurer Lösung zu sich nahm, war der Sauerstoffverbrauch um

16 Proz. vermehrt. Der physiologische Brennwert dieser von *Grafe* zugeführten Substanz ist so gering, daß die stoffwechselsteigernde Wirkung nur auf den Gehalt der Lösungen an NH_3 bezogen werden kann. Den Salzen kommt ja nach den früher zitierten Versuchen von *Benedikt* und *Emmes* keine derartige Wirkung zu. Bei einer anderen Versuchsperson gab *Grafe* 22 g Harnstoff in dünner Bouillon. Hierbei zeigte sich in den ersten Versuchsstunden kein deutlicher Einfluß auf den Stoffwechsel, während in den letzten 3 Stunden eine Zunahme von 8 Proz. sich ergab. In einer anderen Gruppe von Versuchen hat *Grafe* die Wirkung von Aminosäuren und Amiden geprüft. 80 g Alanin in schwarzem Kaffee genommen, führte zu einer geringen Stoffwechselsteigerung von 10 Proz. nach 3 und 4 Stunden; dagegen führten bloß 50 g Alanin bei einem 14jährigen Knaben in den ersten 5 Stunden zu einer 26proz. Steigerung. Bei Verabreichung von 57,5 g Asparagin blieb bei einem Menschen der Einfluß auf den Stoffwechsel vollständig aus, während bei einem anderen Menschen 47,1 g Asparagin zu einer Steigerung von 13 Proz. während 10 Stunden führte. 50 g Glykokoll bei einem 50 kg schweren Mann ergab eine Steigerung, die während $9^1/_4$ Stunden im Durchschnitt 14 Proz. betrug. 42 g Acetamid in Bouillon führte in $5\frac{1}{2}$ Stunden zu 22 Proz. Steigerung. Aus letzterem Versuch geht hervor, daß nicht nur Aminosäuren, sondern auch Säureamide eine ausgesprochene Stoffwechselsteigerung hervorrufen können.

Aus den Versuchen *Grafes* ergibt sich danach, und zwar zitierte ich nur die am Menschen vorgenommenen Versuche, daß die spezifisch-dynamische Wirkung der Eiweißkörper vielleicht *in einer gewissen Beziehung zu ihrem Stickstoffgehalt* steht und wahrscheinlich durch die Annahme einer Reizwirkung durch NH_2 bzw. NH_3 gedeutet werden kann. Ein quantitativer Parallelismus zwischen Stickstoffgehalt der zugeführten Substanz und spezifisch-dynamischer Eiweißwirkung besteht aber nicht, wie sich gerade an den Beispielen *Grafes* zeigen läßt; denn es führten:

	enthaltend g N	zu einer maximalen Sauerstoffverbrauchssteigerung von
12,0 g Ammoniumchlorid	3,1	16 Proz.
80,0 g Alanin	12,64	26 „
47,1 g Asparagin	8,79	13 „
67,5 g „	12,6	0 „
50,0 g Glykokoll	9,35	14 „
42,0 g Acetamid	9,95	22 „

Wie aus diesen Versuchen weiter hervorgeht, hat der Kaloriengehalt der zugeführten Substanz für die Steigerung keine Bedeutung, denn wenn man die aufgetretenen Umsatzsteigerungen in Beziehung bringt zum physiologischen Brennwert der Substanz, so ergeben sich Schwankungen von 0 bis 40 Proz. Diese Ansicht *Grafes* deckt sich auch mit derjenigen der meisten neueren Autoren und insbesonders auch mit *Lusk*, welcher die spezifisch-dynamische Eiweißwirkung folgendermaßen definiert: „Die spezifisch-dynamische Eiweißwirkung besteht in einem spezifisch-chemischen Reiz auf das Zellprotoplasma, welcher unabhängig ist von der Verbrennung des Materials selbst, durch welches der Reiz ausgelöst wird. *Die spezifisch-dynamische Eiweißwirkung ist die durch den Aminosäurereiz bedingte Stoffwechselsteigerung*".

Die Frage, die weiter zu beantworten war, ist die, ob die s. d. E. W. nur nach oraler Verabreichung oder aber auch nach rektaler und ferner nach parenteraler Einverleibung des Eiweißes erfolgt. Was die rektale

Einverleibung von Eiweiß anlangt, so konnte *Schöpp* (25) nach rektaler Zufuhr von größeren Mengen abgebauter Eiweißkörper (*Riba* und *Hapan*) starke Steigerung der Calorienproduktion beobachten.

Betreffs der parenteralen Eiweißzufuhr muß natürlich vor allem berücksichtigt werden, daß die zugeführten Eiweißmengen wesentlich geringer sind als die bei oraler oder rektaler Einverleibung. Wenn auch, wie aus den früher zitierten Versuchen von *Lusk* und *Grafe* hervorgeht, die s. d. E. W. von der zugeführten Menge in weiten Grenzen unabhängig ist, so scheint doch ein bestimmtes Minimum nicht unterschritten werden zu dürfen. Das Eiweißminimum, das parenteral gegeben werden kann, führt nun bekanntlich bei vielen Menschen zu einer fieberhaften Reaktion, und parallel mit dieser Temperaturerhöhung kommt es entsprechend der *vant 't Hoff-Arrhenius*schen Regel [s. *Arist.-Kanitz*, Temperatur und Lebensvorgänge (26)], welche angibt, daß die chemischen Reaktionen um so rascher verlaufen, je höher die Temperatur ist (Reaktionsgeschwindigkeitstemperaturregel, kurz R. G. T.-Regel genannt), auch beim tierischen Organismus bei einer Temperatursteigerung zu einer Steigerung der chemischen Reaktionen und somit zu einer Umsatzsteigerung. Von dem Verhalten der wärmeregulatorischen Funktionen im Organismus hängt es dann ab, ob diese Umsatzsteigerung die Temperaturerhöhung weiter in die Höhe treibt. Kommt es nach der parenteralen Zufuhr von Eiweiß nicht zur Temperaturerhöhung, so bleibt auch die Umsatzsteigerung aus, wie sich dies aus den folgenden, in Tabellen I und II ersichtlichen Versuchen ergibt. Die beiden Versuche wurden mit dem *Krogh*schen (27) Apparat nach der von mir (28) etwas modifizierten und an mehreren Stellen bereits publizierten Methodik durchgeführt. Die beiden Versuchspersonen hatten vor den Untersuchungen die für den *Krogh*schen Versuch notwendige Standarddiät 2 Tage vorher zu sich genommen und blieben, abgesehen von der schluckweisen Zufuhr von Wasser, während des ganzen Versuchstages nüchtern. Der Grundumsatz wurde bei beiden Patienten einige Tage vor dem eigentlichen Versuch in drei Kontrollanalysen bestimmt. Am Versuchstage selbst erhielt der erste Patient, der an multipler Sklerose leidende 35 jährige *R. G.* (170 cm Körperlänge, 62 kg), um 7 Uhr morgens 6 ccm Milch intramuskulär, am zweiten Versuchstage 5 ccm. Hierauf wurde der Grundumsatz in der Zeit von 8 Uhr früh bis 7 Uhr abends sechsmal in je 15 Minuten dauernden Versuchen bestimmt. Am ersten Versuchstage stieg, wie aus Tabelle I ersichtlich ist, die Körpertemperatur von 36,3 auf maximal 39,5, und ganz parallel mit der Temperatur stieg der Umsatz von 1538 Cal auf 1810 Cal, entsprechend einer maximalen Steigerung von 17,6 Proz. Am zweiten Versuchstage stieg der Umsatz von 1510 auf 1827 Cal, die Temperatur des Patienten von 36,1 auf 39,3. Die maximale Umsatzsteigerung war somit 20,9 Proz.

Tabelle I.

Rudolf G. 35 Jahre, 62 kg, 170 cm.

Zeit	Sauerstoff-verbrauch	Umsatz in Calorien	Normalwert	Temperatur
24. III. 1922	219,5	1548	1533	—
25. III.	213	1503	—	—
27. III.	216	1524	—	—
Patient erhält 6 ccm Milch intramuskulär 7 Uhr morgens.				
30. III. 1922 8h . .	218	1538	1533	36,3
10 . .	215	1517	—	36,2
1 . .	217	1533	—	36,6
3 . .	241	1700	—	38,1
5 . .	249,5	1760	—	39,0
7 . .	256	1810	—	39,5
Patient erhält 5 ccm Milch intramuskulär 7 Uhr morgens.				
4. IV. 1922 8h . . .	214	1510	1533	36,1
10 . . .	216	1524	—	36,0
1 . . .	238	1679	—	38,0
3 . . .	244	1720	—	38,8
5 . . .	259	1827	—	39,3
7 . . .	254	1792	—	39,2

Tabelle II.

Ferdinand Sch. 40 Jahre, 62,5 kg, 168 cm.

Zeit	Sauerstoff-verbrauch	Umsatz in Calorien	Normalwert	Temperatur
22. II. 1922	215	1517	1496	—
24. II.	218	1531	—	—
27. II.	210	1448	—	—
Am 3. III. erfolgt eine Injektion von 6 ccm Milch intramuskulär um 7 Uhr morgens.				
3. III. 1922 8h . . .	216	1524	1496	36,2
10 . . .	212	1496	—	36,1
1 . . .	.218	1538	—	36,6
4 . . .	218	1538	—	36,4
6 . . .	215	1517	—	36,9
8 . . .	218	1538	—	36,7

Wie *Pflüger* (31) zeigen konnte, führt eine Temperaturerhöhung des Körpers um 1° zu einer Steigerung des Umsatzes um 8 bis 10 Proz. Bei unseren Untersuchungen führte im ersten Versuch die Temperaturerhöhung von 1,5° zu 10,4 Proz. Umsatzsteigerung, die Temperaturerhöhung von 3,2° aber nur zu 17,6 Proz. Umsatzsteigerung. Ebenso entsprach im zweiten Versuch die Temperaturerhöhung um 1,9° einer Umsatzsteigerung von 11,2 Proz., und eine Temperaturerhöhung um 3,2° einer Umsatzsteigerung um 20,9 Proz. Der zweite Patient, der 40jährige *F. Sch.*, mit Halbseitenparese nach einer im Jahre 1915 erlittenen Kopfschußverletzung (128 cm Körperlänge, 62,5 kg) zeigte

nach intramuskulärer Injektion von 6 ccm Milch keine nennenswerte Temperatursteigerung. Die Temperaturschwankungen im Laufe des Tages blieben in physiologischen Grenzen, die in sechs 15 Minuten dauernden Versuchen aufgenommenen Grundumsatzwerte blieben vollkommen unverändert. Eine gleiche Beobachtung konnte später *A. Leimdörfer* (29) machen, der ebenfalls in unserem Institut Studien über den Einfluß der parenteralen Eiweißzufuhr auf den Stoffwechsel ausführte. *Leimdörfer* konnte mit dem *Zuntz-Geppert*schen Apparat bei einer Versuchsperson, die er allerdings nicht wiederholt im Laufe des Tages, sondern nur einmal 12 bis 14 Stunden nach der Injektion untersuchte, auch nur bei Auftreten von Temperaturerhöhung Umsatzsteigerung beobachten. Die von *Leimdörfer* verwendeten Eiweißpräparate waren zweimal 1 ccm einer 5proz. Caseosanlösung, einmal 10 ccm Aolan und einmal 4 ccm Milch. Alle Injektionen wurden auch hier intramuskulär verabfolgt.

Im Tierexperiment konnten *Zuntz* und *Mehring* (30) nach Injektion von Albumosen und Peptonen Umsatzsteigerung beobachten. Ebenso fand *Grafe* beim Hunde nach subkutaner Injektion von 25 g Glykokoll in 75 ccm Wasser in den ersten 5¾ Stunden 50 Proz. Stoffwechselsteigerung, bei einem anderen Hunde nach subkutaner Injektion von 20 g Alanin in 4¾ Stunden 30 Proz. Umsatzsteigerung. Die im Tierversuch zur subkutanen Anwendung verwendeten Eiweißmengen sind jedenfalls relativ viel größer, als man sie bisher zu therapeutischen Zwecken beim Menschen anzuwenden sich getraut hat, und es ist, wie ich ja schon oben sagte, das Ausbleiben der s. d. E. W. beim Menschen ohne Fieberreaktion vielleicht doch auf die geringe, zur Injektion gelangende Eiweißmenge zurückzuführen. Dazu kommt, daß die parenterale Eiweißzufuhr noch andere Wirkungen zeitigt, wie z. B. Steigerung des Blutzuckergehaltes, was *Weichhardt* (32) nachgewiesen hat, sowie Veränderungen im Agglutiningehalt des Blutes und Änderungen in der Durchlässigkeit der Blutgefäße, wie *E. Starkenstein* (33) zeigen konnte.

Aus letzteren Gründen sowie auf Grund des Ergebnisses der dargestellten Versuche über die s. d. E. W. parenteral verabfolgten Eiweißes wählte ich bei den folgenden Untersuchungen die orale Zufuhr, und zwar wurde ohne Rücksicht auf das Körpergewicht des Patienten 200 g gebratenes Kalbfleisch und 100 g Brot verabfolgt. Untersucht wurden 147 Patienten, an welchen 1132 Gaswechseluntersuchungen vorgenommen wurden. Der Zweck der Untersuchungen war 1., festzustellen, ob die spezifisch-dynamische Eiweißwirkung beim Menschen sowohl hinsichtlich der Intensität als auch hinsichtlich des zeitlichen Eintritts und Ablaufs regelmäßig auftritt, und ob 2. eine Beeinflussung der s. d. E. W. durch das endokrine System erweisbar ist.

R. Plaut (34) hat als erste auf die eventuelle klinische Bedeutung der systematischen Untersuchung der spezifisch-dynamischen Eiweißwirkung hingewiesen und hervorgehoben, daß, wenn der Körper auf zugeführte Nahrung mit zu geringer oder zu starker Vermehrung der Verbrennungen antwortet, dieses auf die Gesamtbilanz ebenso wirke, wie wenn er von vornherein zu wenig oder zu viel verbrennt. Auch *R. Plaut* ging bei ihren Versuchen von der Ansicht aus, daß die spezifisch-dynamische Wirkung nach Eiweißverfütterung am stärksten und konstantesten in Erscheinung tritt, und untersuchte 42 Kranke, denen sie nach Bestimmung des Grundumsatzes 200 g Fleischhack mit 50 g Fett gebraten, 200 g Brot und $\frac{1}{2}$ Liter gezuckerten Kaffee verabfolgte. Nach diesem Frühstück untersuchte sie in der Regel nach $\frac{3}{4}$ Stunden und in der zweiten Stunde den Stoffwechsel und fand regelmäßig bei gut genährten Individuen eine Umsatzsteigerung von 24 bis 30 Proz., wobei der Höhepunkt der Umsatzsteigerung nach $\frac{3}{4}$ Stunden gefunden wurde. *Plaut* fand die s. d. E. W. bei bestimmten Krankheiten herabgesetzt, und zwar 1. bei chronischer Unterernährung, 2. bei bestimmten Arten von Fettsucht. Bei der Unterernährung scheint der Genannten die Herabsetzung der Stoffwechselsteigerung nach Nahrungszufuhr eine zweckmäßige Regulation zu sein, durch welche der Körper Stoff zum Ansatz spart. Wenn aber dieser Regulationsmechanismus gestört sei und die s. d. E. W. unabhängig vom Ernährungszustand zu niedrig ist oder fehlt, so komme es zu einem abnormen Fettansatz. Dieses pathologische Verhalten des respiratorischen Gaswechsels fand *Plaut* bei der konstitutionellen Fettsucht, insbesondere auch bei der mit Erkrankung der Hypophyse in Beziehung gebrachten Dystrophia adiposogenitalis, und sie gründete darauf die Ansicht, daß die s. d. E. W. an die Funktion der Hypophyse gebunden ist: entweder wirke die Hypophyse durch ein Hypophysenhormon derart, daß die Zellen für den Stoffwechselreiz der Nahrung sensibilisiert werden oder ein Hypophysenhormon, welches durch den Nahrungsmittelreiz sezerniert wird, wirke direkt stoffwechselsteigernd. Auf die Theorie *R. Plauts* wird später noch zurückgekommen werden.

Bei den folgenden Untersuchungen wurden 10 Normalfälle, 8 Kranke ohne Stoffwechselstörungen, 22 Fälle, welche klinisch als endokrin erkrankt festgestellt wurden, 61 Fettsüchtige, 29 Hautkranke, 11 psychische Störungen und 6 diverse Fälle untersucht.

Hinsichtlich der Methodik sei noch erwähnt, daß bei allen Patienten zunächst mindestens zweimal der Grundumsatz an zwei aufeinanderfolgenden Tagen untersucht wurde, wobei die gefundenen Werte um nicht mehr als 5 Proz. voneinander differieren durften, wenn die Bestimmung als korrekt angenommen wurde. Der gefundene niedrigste Wert wurde als der für die betreffende Versuchsperson geltende Grund-

umsatzwert angenommen und von diesem die spezifisch-dynamische Eiweißwirkung errechnet, auch wenn die letztere Bestimmung nicht an demselben Tage erfolgte, an welchem der niedrigere Grundumsatzwert gefunden wurde. Dieser Weg erscheint deshalb einwandfrei, weil, wie wir sehen werden, in pathologischen Fällen eine Verminderung der s. d. E. W. viel häufiger in Erscheinung tritt als eine Steigerung, so daß man sich vor Fehlschlüssen besser schützt, wenn man den bei einer Person gefundenen niedrigsten Grundumsatzwert zur Berechnung der s. d. E. W. wählt.

Normalfälle.

Tabelle III zeigt uns zunächst zehn Personen — vier männliche und sechs weibliche — im Alter von 15 bis 41 Jahren, bei denen keinerlei Krankheitszeichen bestanden und bei denen insbesondere keinerlei Zeichen einer endokrinen Störung vorhanden waren. Wir können diese Fälle somit für unsere Untersuchung als Normalfälle bezeichnen. Bei diesen Personen lag der Grundumsatz innerhalb normaler Grenzen, nach Zufuhr des Eiweißfrühstücks kam es zu einer Steigerung des Sauerstoffverbrauchs, welche im Minimum 22,6 Proz., im Maximum 35,3 Proz. betrug. Der Mittelwert aller zehn Untersuchungen ergibt somit eine mittlere Stoffwechselsteigerung von etwa 30 Proz., deckt sich also mit den von verschiedenen Autoren nach Fleischzufuhr bei Menschen gefundenen Werten. Hinsichtlich des zeitlichen Ablaufs der s. d. E. W. kam ich nicht zu dem gleichen Ergebnis wie *R. Plaut*, welche das Maximum der Stoffwechselsteigerung in der Regel noch vor Ablauf der ersten Stunde, etwa ¾ Stunden nach Nahrungszufuhr findet. Wie aus Tabelle III ersichtlich ist, ergab sich das Maximum der Steigerung nach 1 Stunde bei fünf Personen, während bei sieben Personen dieses Maximum erst nach 1½ Stunden erreicht wurde. Ja in fünf von den letzteren sieben Fällen blieb die Umsatzsteigerung nach 60 Minuten noch unter 15 Proz., um nach einer weiteren halben Stunde den Höchstwert zu erreichen. Sowohl in dieser Gruppe von Fällen, als auch in den später zu besprechenden wurde eventuell auch nach 2 Stunden, in einzelnen Fällen nach 2½ Stunden wieder untersucht. Zwei Fälle der Tabelle III zeigen die Steigerung bei der vierten Untersuchung 2 Stunden nach dem Eiweißfrühstück. Es sind dies Fälle, welche einen langsameren Anstieg der Stoffwechselsteigerung zeigen, und doch sank bei beiden der Umsatz nach 2 Stunden rasch wieder ungefähr auf den Wert, der nach 1 Stunde bereits erreicht worden war. Die zehn Fälle dieser Tabelle, welche klinisch sicher als endokrin gesund erkannt waren, können also wohl als Normalfälle bezeichnet werden. *Man kann demnach festlegen, daß beim gesunden Erwachsenen die s. d. E. W. sich in einer Steigerung des Sauerstoffverbrauchs äußert, welcher im Durchschnitt 30 Proz. beträgt, wobei Abweichungen von 10 Proz. nach*

Tabelle III. Normalfälle.

Nr.	Name Alter Körperlänge	Datum	Gewicht[1])	Sauerstoffverbrauch im Grundumsatz in ccm pro Min.	Grundumsatz in Calorien	Grundumsatz Normalwert	Abweichung des Grundumsatzes in Proz.	Spezifisch-dynamische Wirkung: Sauerstoffverbrauchssteigerung in ccm nach 60 Min.	90 Min.	120 Min.	in Proz. nach 60 Min.	90 Min.	120 Min.
1	*Rudolf K.* 15 Jahre, 159 cm	30. XI. 1922	48,5	203,0	1431	1385	+ 3,3	228,9	268,5	—	12,7	32,2	—
2	*Karoline E.* 41 Jahre, 147 cm	9. XII. 1922	44,5	164,1	1158	1192	— 2,9	207,1	201,5	—	26,1	22,8	—
3	*Stephan B.* 34 Jahre, 168 cm	17. XII. 1922	66,0	217,2	1533	1558	— 1,6	294,0	287,4	—	35,3	32,3	—
4	*Wilhelm M.* 22 Jahre, 163 cm	12. III. 1923	66,5	227,6	1605	1607	±	260,9	282,7	265,6	14,7	24,2	16,6
5	*Tilde W.* 33 Jahre, 158 cm	5. IV. 1923	66,5	216,0	1524	1410	+ 8,0	269,3	264,4	—	24,7	22,4	—
6	*Valerie M.* 20 Jahre, 166 cm	23. IV. 1923	63,5	208,7	1473	1419	+ 3,7	266,3	263,9	—	27,6	26,4	—
7	*Berta K.* 31 Jahre, 166 cm	2. VI. 1923	70,0	232,4	1640	1467	+ 11,8	268,6	298,0	—	15,6	28,2	—
8	*Else L.* 24 Jahre, 161 cm	2. VII. 1923	63,5	202,2	1427	1448	0	229,5	247,9	—	13,5	22,6	—
9	*Lilly B.* 25 Jahre, 156 cm	20. IX. 1923	59,0	216,1	1525	1391	+ 9,8	245,5	273,7	—	12,6	26,7	—
10	*Egon Ch.* 23 Jahre, 159 cm	27. IX. 1923	50,5	200,5	1460	1401	„	251,5	210,2	—	25,4	9,3	—

[1]) Die angegebenen Gewichte sind in allen Tabellen die Bruttogewichte, bei welchen zur Berechnung des Grundumsatznormalwertes bei Frauen gewöhnlich 2 kg, bei Männern 3 kg für die Kleider abgezogen wurden.

oben oder unten noch als in den Bereich der Norm fallend aufzufassen sind. Das Maximum der Steigerung wird entweder nach 1 Stunde oder nach 1½ Stunden gefunden. In den Fällen, wo die maximale Umsatzsteigerung erst nach 1½ Stunden eintritt, beträgt die Stoffwechselsteigerung nach 1 Stunde meistens ungefähr die Hälfte des Maximalwertes. Daß *R. Plaut* hinsichtlich des zeitlichen Ablaufs der Reaktion zu einem anderen Ergebnis kommt, hat wahrscheinlich darin seine Ursache, daß sie neben dem Fleisch eine relativ große Menge Kohlehydrate, 200 g Brot und eine nicht angegebene Menge Zucker gibt. Es ist bekannt, daß der Ablauf der Reaktion bei reiner Kohlehydratzufuhr rascher verläuft. Da aber die Kohlehydratwirkung auf den Stoffwechsel, wie ich bereits aus den Arbeiten von *Johannsson* und *Gigon* zitiert habe, inkonstant ist, habe ich von einer Beigabe einer größeren Kohlehydratmenge abgesehen. Eine kleine Kohlehydratgabe von 100 g Brot verabreichte ich aber doch, um zu verhindern, daß der respiratorische Quotient, welcher bei der bei unseren Versuchen eingehaltenen Vortagsdiät 0,8 bis 0,9 beträgt, nicht auf einen zu niedrigen Wert absinke.

Patienten ohne Stoffwechselstörung.

Tabelle IV zeigt weitere acht Personen, drei Männer und fünf Frauen, im Alter von 15 bis 66 Jahren mit verschiedenen Krankheitszuständen, welche klinisch kaum als endokrin bezeichnet werden können. Bei diesen Kranken war der Grundumsatz und die s. d. E. W. innerhalb der Grenzen der Norm gelegen. Nur im Fall 2 einer Splenomegalie war der Umsatz um 17,5 Proz. gesteigert, und im Fall 3, einer 66jährigen Frau mit Hypertonie, um 26,6 Proz. Aber auch in diesen beiden Fällen war die s. d. E. W. analog verlaufend, wie bei den früher besprochenen zehn Normalfällen. Die erreichte Steigerung betrug im Minimum 22,6 Proz., im Maximum 42 Proz., so daß auch hier wieder von einem Durchschnittswert von etwa 30 Proz. gesprochen werden kann. In sechs der untersuchten Fälle war der Höchstwert nach 1½ Stunden und nur in zwei Fällen schon nach 1 Stunde erreicht. Die bei Fall 6 vorgenommene vierte Untersuchung nach 2 Stunden zeigte auch hier ein rasches Absinken vom Höchstwert. Aus dieser Gruppe von Fällen müssen Nr. 4 und 5 besonders hervorgehoben werden. Bei diesen beiden Fällen wurde nämlich eine röntgenologische Schädelaufnahme gemacht (Fall 4 Dr. *Czepa*, Fall 5 Dr. *Kriser*), wobei in ersterem Falle eine leichte Vergrößerung der Sella turcica, im zweiten Falle eine Sella usur gefunden wurde. Dies muß besonders auch mit Rücksicht auf die später zu besprechenden Hypophysenfälle hervorgehoben werden als Beweis dafür, daß röntgenologisch auffindbare Veränderungen der Hypophysengegend keineswegs immer mit einer Stoffwechselsteigerung parallel gehen. Dies ist auch gar nicht zu erwarten, da ja die Stoff-

wechselstörung davon abhängig sein wird, einerseits welcher Teil der Hypophyse entartet ist, und andererseits ob diese Entartung kolloid oder fibrös ist; bei Tumoren muß man auch daran denken, daß durch dieselben, durch Druck oder sonstige Einwirkungen ja auch die benachbarten Hirnpartien, wie die Corpora mamillaria, Hypothalamus, Infundibulum in Mitleidenschaft gezogen sein können, deren Funktionen denen der Hypophyse vielleicht nicht nachstehen.

Haben wir in Tabelle III und IV Fälle gesehen, welche klinisch, mit Ausnahme der beiden Patienten mit den röntgenologisch erkennbaren Veränderungen an der Sella turcica, keine endokrinen Krankheitszeichen boten, und welche einen vollständig normalen Ablauf im respiratorischen Gaswechselversuch zeigten, so sehen wir in den folgenden Tabellen, mit Ausnahme der Tab. IX, durchweg Patienten, bei denen der respiratorische Gaswechsel Abweichungen von der Norm zeigt.

Tabelle IV. Kranke mit normaler s. d. E. W.

Nr.	Name Alter Körperlänge	Datum	Diagnose	Gewicht	Sauerstoffverbrauch im Grundumsatz in ccm pro Min.	Grundumsatz in Calorien	Grundumsatz Normalwert	Abweichung des Grundumsatzes in Proz.	Spezifisch-dynamische Wirkung: Sauerstoffverbrauchssteigerung in ccm nach 60 Min.	90 Min.	120 Min.	in Proz. nach 60 Min.	90 Min.	120 Min.
1	*Marianne K.* 27 Jahre, 159 cm	14. X. 1922	Dyspepsie	48,0	168,1	1185	1263	— 6,1	201,0	209,9	—	19,5	24,8	—
2	*Karl G.* 15 Jahre, 162 cm	25. XI. 1922	Splenomegalie	48,8	198,6	1401	1192	+ 17,5	268,4	265,4	—	35,1	33,7	—
3	*Louise W.* 66 Jahre, 153 cm	21. III. 1922	Hypertonie	62,0	217,0	1531	1213	+ 26,2	239,4	266,0	—	10,3	22,6	—
4	*Laura K.* 46 Jahre, 172 cm	14. VII.	Paralysis agitans	105,5	262,1	1850	1719	+ 7,6	325,0	296,0	—	23,7	13,0	—
5	*Karoline K.* 34 Jahre, 152 cm	12. VII.	Migrän, Sella usur.	64,0	204,0	1439	1402	0	236,0	264,6	—	15,6	30,6	—
6	*Karl E.* 48 Jahre, 154 cm	16. III.	Psychische Impotenz, Depression	54,0	185,3	1308	1214	+ 7,7	233,4	261,0	229,8	25,9	42,0	24
7	*Franz E.* 34 Jahre, 175 cm	10. III.	Paranoia	80,5	247,4	1745	1778	0	310,4	343,4	—	25,8	38,9	—
8	*Johanna W.* 40 Jahre, 154 cm	10. X.	Osteomalacie	84,6	206,5	1457	1505	— 3,0	253,0	254,7	—	22,8	23,3	—

Dysthyreosen.

In Tabelle V sind acht Fälle enthalten, welche als *Dysthyreosen* zu bezeichnen sind. Darunter sind sechs Fälle von echtem, klinisch deutlichem Myxödem, darunter war Fall 5 vor 2 Jahren strumektomiert worden und litt zur Zeit der Untersuchung an einer Tetania strumipriva. Die Grundumsatzverminderung betrug bei diesen Myxödemfällen im Minimum 6,3 Proz., im Maximum 32,8 Proz. Die spezifisch-dynamische E. W. zeigte bei fünf dieser Fälle vollständig normale Werte, im *Minimum 22,1 Proz.* Sauerstoffverbrauchssteigerung, im Maximum 34 Proz. Noch entschiedener als bei den früher besprochenen Normalfällen zeigte auch die Mehrzahl der Myxödemkranken das Maximum der Reaktion auf Eiweißzufuhr erst nach 1½ Stunden. Nur in Fall 5 war nach 1 Stunde schon mit 28,6 Proz. ein hoher Wert erreicht. Der Wert nach 1½ Stunden konnte in diesem Falle leider nicht festgestellt werden, weil die Patientin beim dritten Versuch nicht mehr zu einer gleichmäßigen Atmung zu verhalten war. Von allen sechs Myxödemfällen zeigte nur Nr. 6 eine verminderte s. d. E. W., welche nach 1 Stunde 0,0 Proz., nach 1½ Stunden 12,6 Proz. betrug. Die zwei anderen Fälle dieser Tabelle, Nr. 7 und 8, sind zwei leichte Hyperthyreosen, welche klinisch als Formes frustes des Morbus Basedow zu bezeichnen waren. Sie hatten eine mäßige Steigerung des Grundumsatzes von +18,2 bzw. +22,9 Proz. Die s. d. E. W. bewegte sich auch hier wieder in den Grenzen der Norm und erreichte +22,6 Proz. Sauerstoffverbrauchssteigerung bzw. 31,6 Proz. Im Fall 7 wurde nach Ablauf von 2 Stunden zum drittenmal die s. d. E. W. untersucht und auch hier wieder das Absinken vom Höchstwert am Ende der zweiten Stunde nach Eiweißkost konstatiert. Fall 8 ist deshalb besonders erwähnenswert, weil er ein überaus rasches Absinken von dem mit 31,6 Proz. nach 1 Stunde erreichten Höchstwert auf nur +5,4 Proz. nach 1½ Stunden zeigte.

Aus dieser Gruppe von Fällen ergibt sich also, daß bei isolierter Funktionsstörung der Schilddrüse, welche sich in einer Verminderung oder Steigerung des Grundumsatzes äußert, die s. d. E. W. im allgemeinen normal gefunden wird. Eine Ausnahme zeigte nur der oben bereits erwähnte Fall 6, ein 70jähriger Patient, bei welchem aber vielleicht eine durch das Alter bedingte Involution anderer Drüsen vorlag, so daß gerade in diesem Falle nicht von isolierter oder allein vorherrschender Schilddrüsenunterfunktion gesprochen werden kann. Der Einfluß der Thyreoidintherapie wurde im Fall 1 und 4 beobachtet. Fall 1, der vom 15. Oktober 1922 bis 6. Juni 1923 in Beobachtung stand, erhielt zunächst vom 15. bis 31. Oktober täglich 0,3 g Thyreoidin *Merck*, hierbei stieg der Grundumsatz von −28,7 Proz. auf den Normalwert an, wobei gleichzeitig das Körpergewicht um 6,8 kg absank. Das Aussetzen der Medikation brachte den Grundumsatz nach 7 Wochen

Tabelle V. Dysthyreosen.

Nr.	Name Alter Körperlänge	Datum	Gewicht	Sauerstoffverbrauch im Grundumsatz in ccm pro Min.	Grundumsatz in Calorien	Grundumsatz Normalwert	Abweichung des Grundumsatzes in Proz.	Spezifisch-dynamische Wirkung: Sauerstoffverbrauchssteigerung in ccm nach 60 Min.	in ccm nach 90 Min.	in ccm nach 120 Min.	in Proz. nach 60 Min.	in Proz. nach 90 Min.	in Proz. nach 120 Min.	Bemerkungen
1	*Max K.* 34 Jahre, 162 cm	15. X. 1922	63,8	151,3	1068	1497	— 28,7	182,0	199,9	—	20,0	32,1	—	0,3 Thyreoidin
		31. X.	57,0	204,9	1450	1437	+ 0,9	—	—	—	—	—	—	
		23. XI.	60,0	152,5	1076	1460	— 26,3	—	—	—	—	—	—	
		16. I. 1923	60,0	217,2	1532	1460	+ 4,9	—	—	—	—	—	—	0,3 Thyreoidin
		1. III.	60,0	242,4	1711	1460	+ 17,2	—	—	—	—	—	—	
		6. VI.	62,5	146,8	1036	1490	— 37,1	—	—	—	—	—	—	
2	*Elsa H.* 23 Jahre, 140 cm	19. X.	46,0	116,1	819,1	1220	— 32,8	127,3	151,8	—	9,7	30,8	—	
		30. X.	46,0	126,1	914,8	1220	— 22,9	—	—	—	—	—	—	0,3 Thyreoidin
		10. XI.	42,5	175,3	1237	1185	+ 4,3	—	—	—	—	—	—	
3	*Aurel E.* 48 Jahre, 173 cm	8. I. 1923	75,0	189,0	1334	1611	— 20,7	224,9	253,7	—	18,7	34,2	—	
4	*Ella L.* 48 Jahre, 158 cm	1. II.	69,0	181,8	1283	1364	— 6,3	212,0	222,0	—	16,6	22,1	—	0,3 Thyreoidin
		26. II.	66,5	218,5	1542	1349	+ 14,3	254,2	251,5	—	16,3	15,1	—	
5	*Ida Th.* 28 Jahre, 157 cm	27. II. 1922	54,5	170,5	1203	1316	— 9,3	229,3	—	—	28,6	—	—	
6	*Nathan H.* 70 Jahre, 174 cm	5 VIII. 1923	72,0	149,2	1053	1455	— 27,6	135,5	169,1	—	0	12,6	—	
7	*Gertrud L.* 20 Jahre, 146 cm	17. IV.	54,0	222,5	1570	1328	+ 18,2	264,5	273,0	267,9	18,8	22,6	20,4	
8	*Ida G.* 27 Jahre, 158 cm	10. X. 1922	48,2	224,1	1540	1263	+ 22,9	289,2	231,5	—	31,6	5,4	—	

wieder auf den ursprünglich niederen Wert, worauf die Thyreoidintherapie wieder aufgenommen wurde. Darauf stieg der Grundumsatz wieder auf den Normalwert an, um bei weiterer Fortsetzung der Kur mit + 17,2 Proz. sogar in eine Umsatzsteigerung umzuschlagen. Nach dem Aussetzen der Thyreoidinkur durch 3 Monate fiel der G. U. wieder auf — 37,1 Proz. ab. Im Fall 2 sehen wir durch Thyreoidintherapie in 3 Wochen den G. U. von — 32,8 Proz. auf + 4,3 Proz. ansteigen. Im Fall 4 wurde durch 3 Wochen täglich 0,3 g Thyreoidin *Merck* verabreicht, hierbei stieg der Grundumsatz von — 6,3 Proz. auf + 14,3 Proz. Im letzteren Falle wurde auch die s. d. E. W. nach der Thyreoidinkur untersucht und zeigte 1 Stunde nach Eiweißfrühstück nahezu genau den gleichen Wert wie das erstemal, nach 1½ Stunden aber hatte der Maximalwert, der vor der Thyreoidintherapie + 22,1 Proz. Sauerstoffverbrauchssteigerung betrug, einen Rückgang um 7 Proz. zu verzeichnen. Dieses Absinken der s. d. E. W. bei Myxödem nach Thyreoidinmedikation fanden auch *R. Weiss* und *E. Adler* (35) im Institut Prof. *Biedls* in Prag, wobei sie die Prüfung der spezifisch-dynamischen Wirkung nicht mit Eiweiß, sondern mit Zucker vornahmen. Da ich ein Absinken der s. d. E. W. nach Anstieg des Grundumsatzes und umgekehrt wiederholt beobachten konnte, wird später noch Gelegenheit sein, darauf zurückzukommen.

Vier Zwergwuchsfälle, zwei Akromegalien und ein Hypophysentumor.

Besonderes Interesse verdienen die in Tabelle VI angegebenen vier Fälle von Zwergwuchs und ein Fall von Hypophysentumor. Fall 1 wurde von der Abteilung *Knöpfelmacher*, Fall 2 bis 4 von der Abteilung *Mannaberg* (Assistenten *B. Aschner* und *J. Bauer*) zugewiesen. Das Auffallendste an diesen Fällen ist vor allem, daß bei vier dieser fünf Patienten die s. d. E. W. tief unter der Norm lag, im Fall 4 zeigte sich nach 1 oder 1½ Stunden überhaupt noch keine Reaktion. Nur im Fall 2 mit einem Grundumsatz von — 8,2 Proz. unter der Norm wurde am Ende der zweiten Stunde der Wert von + 20,7 Proz. erreicht, der nach 2½ Stunden sodann wieder auf + 7,3 Proz. abfiel. Die Wichtigkeit gerade dieser vier Fälle für die Beurteilung der s. d. E. W. läßt es notwendig erscheinen, das für die endokrine Beurteilung Wichtigste aus den Krankengeschichten mitzuteilen, während ich es sonst nach Tunlichkeit unterlasse, Krankengeschichten zu bringen, um den Umfang dieser Abhandlung nicht übermäßig auszudehnen und die Übersichtlichkeit des Materials nicht zu stören.

Fall 1. Die 9jährige *Paula H.*, 117 ccm Körperlänge, 26,5 kg. Klinische Diagnose: Dysplasia adiposo genitalis — ist ein für sein Alter sehr kleines, dabei übergewichtiges Kind, Fettpolster am ganzen Körper, insbesondere aber an den Brüsten, Unterbauchgegend und ad nates. Muskulatur

Tabelle VI.

Vier Zwergwuchsfälle, eine Akromegalie und ein Hypophysentumor.

Nr.	Name Alter Körperlänge	Datum	Gewicht	Sauerstoffverbrauch im Grundumsatz in ccm pro Min.	Grundumsatz in Calorien	Grundumsatz Normalwert	Abweichung des Grundumsatzes in Proz.	Spezifisch-dynamische Wirkung: Sauerstoffverbrauchssteigerung in ccm nach 60 Min.	in ccm nach 90 Min.	in ccm nach 120 Min.	in Proz. nach 60 Min.	in Proz. nach 90 Min.	in Proz. nach 120 Min.	Bemerkungen
1	*Paula H.* 9 Jahre, 117 cm	26. II.	26,5	153,8	1085	1050	+ 3,3	158,6	166,6	159,7	3,1	8,3	3,8	
2	*Rudolf K.* 16 Jahre, 111 cm	18. III.	21,5	106,1	748,4	810	— 8,2	116,3	123,3	128,1	9,7	16,2	20,7	Nach 2½ Stunden 7,3 Proz. Vorderlappenmedikation
		24. IV.	22,0	109,0	751,7	815	— 8,5	110,1	139,4	128,5	0	27,8	17,8	
3	*Max Pf.* 63 Jahre, 124 cm	8. IV.	32,0	125,7	886	918	— 3,6	129,1	131,5	137,4	2,7	4,5	9,3	Pathologischer Röntgenbefund an der Hypophyse
4	*Marie B.* 19 Jahre, 139 cm	8. X.	33,5	189,9	1340	1159	+ 15,6	192,6	187,1	—	0		—	Seichte Sella turcica
5	*Max B.* 25 Jahre, 165 cm	3. IV.	76,0	245,4	1732	1727	± 0	277,9	267,6	253,1	13,2	9,0	3,1	Sella klein
6	*Helene N.* 37 Jahre, 153 cm	29. X.	82,5	206,7	1458	1535	— 5,3	221,5	208,0	—	7,2	0	—	Hypophysentumor
7	*Rene S.* 25 Jahre, 152 cm	17. XI.	69,5	280,3	1926	1447	+ 33,2	485	358,8	—	77	31,3	—	Destruktion der Sella

Tabelle VII. Keimdrüseninterfunktion.

Nr.	Name Alter Körperlänge	Datum	Gewicht	Sauerstoffverbrauch im Grundumsatz in ccm pro Min.	Grundumsatz in Calorien	Grundumsatz Normalwert	Abweichung des Grundumsatzes in Proz.	in ccm nach 60 Min.	in ccm nach 90 Min.	in ccm nach 120 Min.	in Proz. nach 60 Min.	in Proz. nach 90 Min.	in Proz. nach 120 Min.	Bemerkungen
1	*Wilhelmine F.* 41 Jahre, 160 cm	13. III.	61,0	171,9	1213	1323	— 9,1	209,8	189,2	—	22,1	10,0	—	
2	*Gisela T.* 36 Jahre, 160 cm	19. II.	68,0	178,2	1257	1414	— 13,3	251,5	265,3	—	41,1	48,9	—	
3	*Wilhelm H.* 18 Jahre, 168 cm	29. VIII.	56,0	163,1	1151	1501	— 23,3	212,0	225,7	—	30,1	38,0	—	

durch den dicken Panniculus adiposus kaum tastbar. Die Skelettproportion entspricht nicht dem eines 9jährigen, sondern dem eines 5jährigen Kindes. Die gynäkologische Untersuchung (Doz. *Blau*) ergibt eine Hypoplasie des Genitalis, Uterus als erbsengroßes Knöpfchen angedeutet. Ovarien kaum tastbar. Der Grundumsatz der Untersuchten war normal, die s.d.E.W. zeigte 1, 1½ und 2 Stunden nach Eiweißfrühstück 3,1, 8,3 und schließlich 3,8 Proz. Sauerstoffverbrauchsteigerung. Also der nach 1½ Stunden erreichte Höchstwert ist deutlich vermindert und sinkt nach 2 Stunden bereits rasch wieder ab.

Ganz ähnlich niedere Werte für die s.d.E.W. zeigt Fall 3, der 62jährige *Max P.* Aus dem von *Aschner* und *Bauer* erhobenen klinischen Befund sei folgendes mitgeteilt: Jugendliches Aussehen, Haut nicht gerunzelt, fettreich. Geringer Fettansatz am Unterbauch, Testikel olivengroß, matschweich. Penis entsprechend. Nie Libido, nie Koitus. Altweiberbart, Anflug von Schnurbart, Crines axillae vereinzelt, Crines ad pubes spärlich, feminin begrenzt. Thyreoidea kaum palpabel. Röntgenbefund (*Kienböck*): Sella turcica auffallend klein, etwas undeutlich konturiert, proc. clin. ant. groß, keulenförmig, Dorsum sellae nach vorne geneigt. Die Skelettproportionen ergeben sich aus folgenden Zahlen: Körperlänge 124 cm, Unterlänge 66,5, Oberlänge 62,5, Spannweite 129,5. Klinische Diagnose: Hypophysärer Zwergwuchs. Der Grundumsatz bei dem Untersuchten war normal, die s.d.E.W. war stark herabgesetzt und hinsichtlich des zeitlichen Eintrittes verspätet. Denn in diesem Falle sehen wir nach 1 Stunde eine Sauerstoffverbrauchsteigerung von 2,7 Proz., nach 1½ Stunden 4,5 Proz. und erst nach 2 Stunden von 9,3 Proz.

Ein vollständiges Ausbleiben der s.d.E.W. zeigt Fall 4. Es ist dies die 19jährige *Marie B.*, 33,5 kg, mit eunuchoiden Skelettproportionen. Körperlänge 139,5 cm, Oberlänge 65 cm, Unterlänge 74,5 cm, Spannweite 152 cm. Ausgesprochene Genitalhypoplasie, noch nicht menstruiert, keine Crines. Röntgenbefund: Sella etwas seicht, aber noch im Bereich des Normalen. Bei dieser Patientin liegt der Grundumsatz etwas über der oberen Grenze der Norm, die s.d.E.W. ist vollständig fehlend. Die klinische Diagnose lautete hypophysäre Nanosomie.

Fall 2. Der ebenfalls als hypophysärer Zwergwuchs bezeichnete 16jährige *Rudolf K.*, ergab folgenden klinischen Befund: Bei Geburt 4 kg, seit einer schweren fieberhaften Erkrankung im Alter von etwa 4 Monaten im Wachstum zurückgeblieben, hat mit 13 Monaten gehen gelernt und frühzeitig gesprochen. Zahnwechsel verspätet. Normale Intelligenz, ernst, sucht gleichaltrige Genossen. Skelettproportionen: Körperlänge 111 cm, Unterlänge 57 cm, Oberlänge 54 cm, Spannweite 109 cm. Fettpolster mäßig entwickelt, zeigt infantile Lokalisation. Extreme Genitalhypoplasie, keine sekundären Geschlechtscharaktere. Schilddrüse nicht deutlich zu tasten; Röntgen: Sella ohne Befund. Die Ossifikation des Handskelettes entspricht einem 7- bis 8jährigen Kinde. Thymusdämpfung, subnormale Temperatur bis 35,6° (der Patient wurde am Wiener Kongreß für innere Medizin 1923 von *J. Bauer* vorgestellt). Der Stoffwechselbefund zeigte folgende Werte: der Grundumsatz war auf 8,2 Proz. vermindert, lag also an der unteren Grenze der Norm, die s.d.E.W. war verlangsamt, erreichte aber nach 2 Stunden mit 20,7 Proz. annähernd den Normalwert, um nach 2½ Stunden rasch auf 7,3 Proz. abzufallen. Bei diesem Falle ist also die s.d.E.W. quantitativ annähernd normal. Bei diesem Patienten ist folgendes hervorzuheben: Er erhielt an der Poliklinik (Abt. *Mannaberg*)

durch 4 Wochen 5 Ampullen Präphyshormon und 3 Ampullen Anteglandol subkutan injiziert. Die nach 4 Wochen neuerlich vorgenommene Stoffwechseluntersuchung zeigte einen unveränderten Grundumsatz von − 8,5 Proz., die s. d. E.W. war quantitativ um 7,1 Proz. angestiegen auf + 27,8 Proz. nach $1^1/_2$ Stunden, um bereits nach 2 Stunden auf + 17,8 abzufallen. Der Höchstwert war also früher als vor der Hypophysenvorderlappentherapie aufgetreten, die ganze Reaktion also rascher verlaufen. Ob wir aus dieser Einwirkung der Hypophysenvorderlappentherapie auf die s. d. E. W. zwingende Schlüsse ziehen können, soll an der Hand von noch später zu besprechenden Fällen gezeigt werden.

Im Anschluß an die besprochenen Fälle von Zwergwuchs seien auch zwei Fälle von Akromegalie besprochen, leider kamen nicht mehr Fälle dieser Art zur Untersuchung des respiratorischen Gaswechsels.

Fall 5. Bei dem 25 jährigen *Max B.*, 165 cm Körperlänge, 76 kg (Abt. *Mannaberg*) hatte sich die Akromegalie seit dem Jahre 1919 langsam entwickelt. Klinisch zeigte er leichte Adipositát bei gleichmäßiger Fettverteilung. Neurologisch normaler Befund. Röntgenbefund: Sella klein, Proc. clin. ant. und post. plump. Die Untersuchung des respiratorischen Gaswechsels ergab einen normalen Grundumsatz, die s. d. E. W. ergab nach 1, 1½ und 2 Stunden Sauerstoffverbrauchssteigerungen von 13,2, 9 und 3,1 Proz. Wir sehen also bei der Akromegalie hinsichtlich der s. d. E.W. in diesem Fall ein gleiches Verhalten, wie bei den klinisch als hypophysärer Zwergwuchs sichergestellten Fällen. Hingegen zeigte Fall 7 eine 25 jährige Patientin mit hochgradiger Akromegalie mit Destruktion der Sella (*Holzknecht*) einen gesteigerten G. U. von + 33,2 Proz. und eine s. d. E. W., welche mit 77 Proz. Sauerstoffverbrauchssteigerung 1 Stunde nach Eiweißkost den höchsten Wert erreichte, den ich überhaupt bisher beobachten konnte. Hinsichtlich des Grundumsatzes finden sich bei der Akromegalie in der Literatur einander widersprechende Angaben. *Magnus-Levy* (36) und *M. Boothby* (37) fanden bei ihren Fällen erhöhte Werte, *Hugo Salomon* (39) sah in einem Falle einen erhöhten, in zwei anderen Fällen normale Grundumsatzwerte. Über die s. d. E. W. liegen meines Wissens in der Literatur bisher keine Beobachtungen bei der Akromegalie vor. Es wird daher erst nach einer größeren Anzahl von Bestimmungen des Grundumsatzes und der s. d. E.W. bei Akromegalen eine sichere Angabe über den Verlauf des respiratorischen Gaswechsels bei dieser Krankheitsform zu erzielen sein.

Es kann jedenfalls auf Grund dieser Fälle sowie dem des beschriebenen Patienten mit hypophysärem Zwergwuchs, sowie mit Rücksicht auf die Steigerung der s. d. E.W. nach Zufuhr von Hypophysenvorderlappenpräparaten bei einem hypophysären Zwerg festgestellt werden, daß krankhafte Veränderungen der Hypophyse meistens eine Änderung der spezifisch-dynamischen Eiweißwirkung zeigen. Dies bestätigt auch Fall 6, eine 37 jährige Patientin (Prof. *L. Braun*) mit einem nußgroßen, die Sella turcica vollständig usurierendem Hypophysentumor (Röntgenbefund *G. Schwarz*). Bei dieser Patientin war der Grundumsatz mit − 5,3 Proz. leicht vermindert, die s. d. E.W. in hohem Grade herabgesetzt.

Keimdrüsenunterfunktion.

Den Einfluß der vorherrschenden Unterfunktion der Keimdrüsen zeigt Tabelle VII mit drei Fällen. Fall 1 ist eine 41 jährige Frau, bei der vor 16 Jahren die beiderseitige Kastration durchgeführt wurde. Fall 2,

der jetzt 18jährige *Wilhelm St.*, der im Alter von 2 Jahren, soweit festgestellt werden konnte, wegen Hodentuberkulose kastriert wurde, und Nr. 3, eine 36jährige Patientin mit den klinischen Erscheinungen einer ovariellen Unterfunktion. Die drei Fälle zeigen untereinander ein vollkommen analoges Verhalten hinsichtlich ihres respiratorischen Gaswechsels. In allen drei Fällen findet sich eine Verminderung des Grundumsatzes, und zwar um — 19,1, — 23,3 und — 13,1 Proz. Hingegen zeigt die s.d.E.W. in allen Fällen normale Werte. Diese Fälle unterscheiden sich dadurch von den früher besprochenen Zwergwuchsfällen, obgleich auch bei einzelnen derselben hypogenitale Erscheinungen beobachtet werden konnten. Bei vorherrschender Keimdrüsenunterfunktion oder Keimdrüsenausfall, wie bei den Fällen dieser Tabelle ist das Augenfällige die starke Verminderung des Grundumsatzes. Eine Verminderung der s.d.E.W. war in keinem Falle vorhanden, im Gegenteil zeigt Fall 2 mit einer maximalen Steigerung des Sauerstoffverbrauches von + 48,9 Proz. eher einen den Normalwert übersteigenden Wert, und auch in Fall 2 lag mit + 38,2 Proz. die Sauerstoffverbrauchssteigerung nach Eiweißfrühstück an der oberen Grenze der Norm. Es liegt nahe, diese eventuell zu beobachtende Steigerung der s.d.E.W. für eine für den Ausfall der Stoffwechselwirkung der Keimdrüsen auftretende paradoxe Wirkung einer anderen endokrinen Drüse aufzufassen.

Infantilismus.

Ein ähnliches Verhalten hinsichtlich der s.d.E.W. wie die Fälle der Tabelle VII zeigen die vier Fälle der Tabelle VIII, welche klinisch als Infantilismus bzw. Hypogenitalismus bezeichnet wurden.

Fall 1. Der 22jährige, 160 cm große *Franz H.*, klinisch untersucht von *J. Bauer*, *P. Federn* und *G. Holzknecht*, zeigte klinisch ausgesprochen eunuchoide Skelettproportionen (übermäßig lange Extremitäten und ausgesprochen eunuchoide Verteilung des ziemlich reichlichen subkutanen Fettgewebes). Hochgradige Genitalhypoplasie, Hoden beide etwa bohnengroß, spärliche Härchen am Mons pubis und in den Achselhöhlen, sonst keine Stammbehaarung. Geroderma (Furchen und Runzeln an Stirn und Wangen), breites feminines Becken, Genua valga. Hohe Stimme, auffallend gute Intelligenz. Schilddrüse tastbar, von palpatorisch normaler Beschaffenheit. Thymus perkutorisch deutlich nachweisbar. Keine auf Hypophysenerkrankung hinweisende Symptome (Gesichtsfeld, Harn usw.). Kleines verkümmertes Genitale, linker Hoden kryptorch, rechter Hoden etwa kleinnußgroß. Röntgenbefund: Sella grob verändert, ihre Tiefenausdehnung ist gering und die Proc. clin. post. sind mächtig, ich möchte sagen, leontiastisch entwickelt und sind auffallend dick und plump gestaltet. Der Stoffwechselbefund zeigt eine Verminderung des Grundumsatzes um 21,6 Proz., was wohl hauptsächlich auf den ja auch klinisch festgestellten Hypogenitalismus bezogen werden mußte. Interessant ist im Zusammenhang mit dem von *Holzknecht* erhobenen Röntgenbefund der Hypophysengegend die s.d.E.W. Es zeigt sich nach einer Stunde ein vollständiges Fehlen der s.d.E.W., um aber nach 1½ Stunden auf 44,6 Proz. Sauerstoffverbrauchssteigerung, ich möchte sagen explosionsartig anzusteigen und einen übernormalen Wert zu erreichen, wie wir es auch früher bei Fällen mit Keimdrüsenausfall gesehen haben.

Wenn ich früher der Vermutung Ausdruck verlieh, daß sich bei Hypogenitalen vielleicht die paradoxe Wirkung einer anderen endokrinen Drüse geltend macht, so weist dieser Fall durch den röntgenologischen Befund

Tabelle VIII. Infantilismus.

Nr.	Name Alter Körperlänge	Datum	Gewicht	Sauerstoffverbrauch im Grundumsatz in ccm pro Min.	Grundumsatz in Calorien	Grundumsatz Normalwert	Abweichung des Grundumsatzes in Proz.	Spezifisch-dynamische Wirkung: Sauerstoffverbrauchssteigerung in ccm nach 60 Min.	in ccm nach 90 Min.	in ccm nach 120 Min.	in Proz. nach 60 Min.	in Proz. nach 90 Min.	in Proz. nach 120 Min.	Bemerkungen
1	*Franz H.* 22 Jahre, 160 cm	9. II.	60,6	181,8	1283	1511	— 21,6	181,3	262,7	—	θ	44,6	—	Grobe Veränderung an der Sella turcica
2	*Leopold Sch.* 16 Jahre, 142 cm	17. IV.	38,0	176,4	1274	1146	+ 10,2	232,4	226,0	238,1	31,8	28,1	34,9	
3	*Ignatz Str.* 17 Jahre, 141 cm	4. V.	39,5	183,0	1991	1144	+ 12,8	207,6	216,5	221,5	10,7	18,7	21,0	
		15. X.	43,0	215,0	1522	1214	+ 25,2	240,0	268,4	—	11,6	19,9	—	
		26. X.	45,0	237,4	1675	1259	+ 33,0	—	—	—	—	—	—	
		21. XI.	46,5	217,0	1532	1273	+ 29,6	—	—	—	—	—	—	
4	*Robert B.* 14 Jahre, 151 cm	26. V.	63,0	222,3	1568	1568	θ	252,0	257,9	—	13,8	16,0	—	

Tabelle IX. Fettsüchtige mit normalem G. U. und normaler s. D. E. W.

Nr.	Name Alter Körperlänge	Datum	Gewicht	Sauerstoffverbrauch im Grundumsatz in ccm pro Min.	Grundumsatz in Calorien	Grundumsatz Normalwert	Abweichung des Grundumsatzes in Proz.	in ccm nach 60 Min.	in ccm nach 90 Min.	in ccm nach 120 Min.	in Proz. nach 60 Min.	in Proz. nach 90 Min.	in Proz. nach 120 Min.	Bemerkungen
1	*Marie H.* 38 Jahre, 164 cm	15. XI.	89,5	239,3	1690	1628	+ 3,8	263,0	300,7	—	9,9	25,7	—	
2	*Alfred K.* 54 Jahre, 155 cm	23. XI.	90,0	246,2	1737	1674	+ 3,7	302,3	329,8	—	22,7	33,9	—	
3	*Betty B.* 34 Jahre, 159 cm	16. I.	84,0	247,2	1744	1574	+ 10,7	337,0	277,8	—	36,3	12,4	—	
4	*Erwin L.* 25 Jahre, 158 cm	27. III.	102,0	256,7	1812	1807	θ	312,3	349,9	—	23,6	36,0	—	
5	*Anna K.* 47 Jahre, 158 cm	18. VII.	114,5	275,8	1946	1852	+ 5,0	362,3	361,7	—	31,3	31,1	—	
6	*Martha N.* 43 Jahre, 158 cm	26. VII.	78,0	213,4	1505	1492	θ	266,7	231,2	—	24,9	8,6	—	

an der Hypophyse mit Wahrscheinlichkeit darauf hin, daß diese stoffwechselkompensatorische Tätigkeit die Hypophyse übernimmt.

In Fall 2 und 3 zeigten sich Grundumsatzwerte an der oberen Grenze der Norm, Fall 4 hatte einen normalen Umsatz. Im Fall 2 ist die s.d.E.W. analog den hier einzureihenden Fällen hoch, in Fall 3 und 4 aber an der unteren Grenze der Norm. Fall 2, der 15jährige *Leopold Sch.*, mit der klinischen Diagnose Infantilismus (Abt. *Mannaberg*). Skelettproportionen: 142 cm Körperlänge, 72 cm Unterlänge, 70 cm Oberlänge, 142 cm Spannweite, mäßige Struma, positive Thymusdämpfung. Testikel bohnengroß, keine Behaarung in Axilla und ad pubes, kindisches Wesen. Fall 3, der 17jährige *Ignaz St.*, klinische Diagnose Infantilismus (Abt. *Mannaberg*). Skelettproportionen: 141 cm Körperlänge, 72,5 cm Unterlänge, 68,5 cm Oberlänge, 150 cm Spannweite. Hyperplasie der Parotis, linker Testikel mandelgroß, weich, rechter kryptorch, keine Crines in Axilla, nur vereinzelt ad pubes, positive Thymusdämpfung. Röntgenologisch: Sella normal. Dieser Fall verdient besonderes Interesse, weil bei diesem Patienten auch der *Einfluß der Hodenimplantation auf den respiratorischen Gaswechsel* studiert werden konnte. Es wurde bei dem Genannten, der seit der ersten Untersuchung anfangs Mai 1923 bis zum 15. Oktober um 2 cm gewachsen war und 3½ kg zugenommen hatte, am 2. Oktober durch *O. Schwarz* ein hypertrophischer Hoden, der einem erethischen Idioten entnommen worden war, implantiert. Die 13 Tage nach der Implantation vorgenommene Gaswechseluntersuchung ergab einen *auf + 25,2 Proz.*, also um 12,4 Proz. *gesteigerten Grundumsatz*, während die s.d.E.W. vollständig unverändert geblieben war. Die Werte für die Sauerstoffverbrauchssteigerung waren am 4. Mai 1923 10,7, 18,7 und 21 Proz. Am 15. Oktober 1923 11,6 und 19,9 Proz. Dies ist aus zwei Gründen interessant. Erstens zeigt es, daß bei einem Falle, bei dem keine paradoxe Steigerung der s.d.E.W. bei Keimdrüsenunterfunktion auftritt, nach Keimdrüsenimplantation keine Änderung der s.d.E.W. auftritt, wohl aber eine Steigerung des Grundumsatzes. Diese Steigerung des Grundumsatzes hält an, denn am 27. Oktober, also bereits 4 Wochen nach der Operation, hatte der Patient noch immer einen gesteigerten Grundumsatz von + 33 Proz. Nach weiteren 4 Wochen, also 8 Wochen nach der Implantation, sank der G. U. auf + 20,6 Proz. ab, lag aber noch immer um 20 Proz. höher als vor der Operation. Letzteres Ergebnis stimmt mit zahlreichen Tierversuchen dieser Art überein. Der Ausfall der s.d.E.W. 5 Monate nach der ersten Untersuchung dieser Art bei demselben Patienten zeigt, daß die s.d.E.W., bei demselben Menschen auch in längeren Zeiträumen wiederholt, unverändert bleibt. Dies ist eine für diese Untersuchungsmethodik wichtige Erkenntnis, weil wir Veränderungen bei der s.d.E.W. nach Zuführung von Hormonpräparaten, wie wir später sehen werden, dann mit Sicherheit auf diese Hormonwirkung beziehen dürfen.

Beim Infantilismus finden wir nicht immer die gleichen Verhältnisse im Stoffwechsel, wie wir sie z. B. beim echten auf Keimdrüsenausfall zu beziehenden Hypogenitalismus gefunden haben; diese Ungleichmäßigkeit der Ergebnisse im respiratorischen Gaswechsel beim Infantilismus darf nicht wundernehmen. Es decken sich diese Befunde mit der von *J. Bauer* (39) ausgesprochenen Ansicht, daß beim Infantilismus universalis nicht eine Anomalie einer bestimmten Blutdrüse anzunehmen ist, sondern daß eine Entwicklungshemmung allgemeiner Natur des Gesamtorganismus vorliegt, wobei die Hypoevolution des Blutdrüsensystems derjenigen des

Knochensystems des Zirkulations- und hämatopoetischen Apparates sowie anderer Organe koordiniert ist. Es ist also begreiflich, wenn wir im Stoffwechsel beim Infantilismus einen normalen Wert finden, wie im Falle 2, sowohl für Grundumsatz als auch für die s.d.E.W., während wir im Falle 1 einen deutlichen Minuswert für den Grundumsatz als Ausdruck einer thyreogenen, eventuell Keimdrüsenunterfunktion finden und das absonderliche Verhalten der s.d.E.W., und daß hinwiederum die Fälle 3 und 4 auch Fälle von Infantilismus universalis keine Verminderung des Grundumsatzes, wohl aber eine mäßige Verminderung der s.d.E.W. (Werte an der unteren Grenze der Norm) zeigen. Es bestätigt also der Ausfall obiger Stoffwechselversuche die Ansicht derjenigen Autoren, welche den Infantilismus universalis nicht als primäre Störung einer bestimmten Blutdrüse auffassen, sondern im Gegenteil den Ausfall der Funktion einer oder mehrerer Blutdrüsen als Teilerscheinung der Entwicklungshemmung des Gesamtorganismus betrachten. Aus dem Ausfall der Untersuchung des respiratorischen Gaswechsels können wir allerdings in manchen Fällen feststellen, welche der wichtigsten Blutdrüsen in ihrer Funktion am meisten gestört ist.

Fälle von Fettsucht.

Die im vorhergehenden gefundenen Normalwerte sowie die Ergebnisse bei den klinisch sichergestellten endokrinen Krankheitsfällen werden uns bei den im folgenden zur Besprechung gelangenden Fällen von Fettsucht eine leichtere Beurteilung ermöglichen. Im ganzen wurden 61 Fälle von Fettsucht untersucht, welche in den Tabellen IX bis XII zur Darstellung gelangen. Mit Rücksicht auf die Größe des Materials muß selbstverständlich von einer Anführung der Krankengeschichten dieser Fälle abgesehen werden. Dazu kommt, daß ja nur bei einzelnen dieser Fälle klinisch der Ausfall einer endokrinen Funktion mit Sicherheit (nach Thyreodektomie oder Kastration) feststellbar war. Das Material der Fettsüchtigen ist in den folgenden Tabellen nach dem Ausfall des Grundumsatzes und der s.d.E.W. geordnet.

Fettsüchtige mit normalem G. U. und normaler s. d. E. W.

Tabelle IX zeigt zunächst sechs Fälle, bei denen sowohl der Grundumsatz als auch die s.d.E.W. vollständig normal waren. Dabei befinden sich unter diesen Kranken ganz respektable Fettsüchtige. Denn das geringste Körpergewicht zeigte die 43jährige *Martha N.* mit 78 kg bei 158 cm Körperlänge. Drei Patienten dieser Tabelle haben ein Körpergewicht über 100 kg, die 47jährige *Amalie K.* bei 158 cm Körperlänge sogar 114,5 kg. Man wird nicht fehlgehen, wenn man in der Mehrzahl der Fälle derartige Fettsüchtige, welche sowohl einen normalen Grundumsatz als auch eine normale s.d.E.W. erkennen lassen, in die Gruppe der exogenen Fettsucht im Sinne *v. Noordens* einreiht. Es ist dies eine durch Überernährung bedingte Fettsucht, die eventuell noch gefördert und gesteigert wird durch einen sehr geringen Grad des Leistungszuwachses bei körperlich trägen, bewegungsscheuen Individuen, welche Krankheitsform *Noorden* mit Recht als Faulheitsfettsucht bezeichnet. Zahlreiche Autoren haben bei diesen Fällen von exogener Fettsucht den Grundumsatz untersucht und ihn ebenso wie bei meinen Fällen normal gefunden (*Noorden, Jaquet* und *Svenson, Harris* und *Benedikt*). Wenn man, wie dies bisher immer geschah,

Tabelle X.

Fettsüchtige mit vermindertem G. U. und normaler oder gesteigerter s. d. E. W.

Nr.	Name, Alter, Körperlänge	Datum	Gewicht	Sauerstoffverbrauch im Grundumsatz in ccm pro Min.	Grundumsatz in Calorien	Grundumsatz Normalwert	Abweichung des Grundumsatzes in Proz.	Spezifisch-dynamische Wirkung: Sauerstoffverbrauchssteigerung in ccm nach 60 Min.	in ccm nach 90 Min.	in ccm nach 120 Min.	in Proz. nach 60 Min.	in Proz. nach 90 Min.	in Proz. nach 120 Min.	Bemerkungen
1	*Lilly W.* 28 Jahre, 155 cm	1922 6. XII.	70,5	189,2	1335	1466	— 9,0	240,2	260,6	—	26,9	4,3	—	
2	*Mathilde E.* 40 Jahre, 165 cm	23. XII.	92,0	206,8	1459	1634	— 11,9	245,9	264,9	—	18,9	27,9	—	Thyreoidin + Präphyson
		1. II. 1923	92,0	203,1	1433	1634	— 14,0	232,4	277,8	—	14,4	35,3	—	
		27. II.	89,0	179,8	1268	1604	— 26,5	225,2	249,7	—	25,2	38,3	—	
		23. III.	88,0	224,0	1580	1594	± θ	235,8	251,7	243,9	5,2	12,4	8,8	Thyreoidin allein
		16. VI.	85,0	109,0	1404	1564	— 11,3	217,6	232,8	—	9,0	16,5	—	Keine Medikation
3	*Lotte R.* 35 Jahre, 147 cm	21. I.	78,0	171,4	1209	1492	— 23,4	229,0	211,0	—	33,1	23,1	—	
4	*Paula T.* 20 Jahre, 165 cm	20. II.	96,0	214,4	1513	1766	— 16,7	260,7	268,0	—	21,6	25,0	—	
5	*Wilhelm W.* 33 Jahre, 175 cm	27. II.	93,0	213,4	1506	1957	— 23,6	304,5	347,6	—	43,1	62,8	—	
6	*Friedrich K.* 16 Jahre, 165 cm	2. III.	83,5	229,4	1619	1881	— 13,9	260,4	300,4	—	13,5	30,9	—	
7	*Martha F.* 30 Jahre, 154 cm	7. III.	73,0	180,8	1275	1479	— 16,0	245,4	256,0	—	35,7	42,1	—	
8	*Gisela L.* 42 Jahre, 150 cm	13. III.	76,4	174,6	1232	1450	— 17,6	212,7	250,5	—	21,8	43,4	—	
		19. IV.	74,5	195,8	1381	1430	— 3,5	—	—	—	—	—	—	
9	*Viktor E.* 33 Jahre, 152 cm	19. IV.	86,5	196,7	1389	1766	— 27,1	249,7	258,5	—	26,6	31,4	—	
10	*Edith N.* 12 Jahre, 155 cm	13. IV.	65,0	192,8	1360	1492	— 8,8	254,3	259,7	·	31,8	34,6	—	

[illegible]	32 Jahre, 155 cm	[illegible]. IV.	[illegible]	309,5	1480	1591	— 7,4	261,4	268,4	—	24,6	27,9	—
12	*Fritz H.* 23 Jahre, 176 cm	11. V.	102,0	260,5	1838	2153	— 17,1	331,2	288,9	—	27,1	10,9	—
13	*Regine W.* 39 Jahre, 150 cm	15. V.	81,0	184,7	1303	1506	— 13,4	229,0	243,2	—	23,9	31,6	—
14	*Liese H.* 38 Jahre, 153 cm	25. V.	78,0	198,6	1401	1487	— 5,8	257,9	262,3	—	29,8	32,0	—
15	*Isabella L.* 34 Jahre, 158 cm	1. VI.	88,0	194,6	1373	1611	— 17,3	298,2	230,7	—	53,2	18,3	—
16	*Rosa K.* 34 Jahre, 169 cm	2. VI.	96,0	223,1	1574	1708	— 8,5	271,2	276,7	—	21,5	24,0	—
17	*Otto H.* 23 Jahre, 160 cm	14. VI.	81,5	246,5	1739	1836	— 5,6	298,0	276,9	—	20,9	12,3	—
18	*Siegfried L.* 30 Jahre, 166 cm	5. VII.	79,0	207,5	1464	1578	— 7,7	251,6	263,6	—	21,2	26,8	—
19	*Franz P.* 41 Jahre, 163 cm	12. VII.	94,0	195,1	1376	1926	— 28,5	289,7	265,0	—	48,4	35,7	—
20	*Jozka N.* 44 Jahre, 147 cm	13. VII.	72,5	191,0	1347	1402	— 4,0	229,0	238,0	—	19,8	24,6	—
21	*Emma U.* 50 Jahre, 156 cm	13. VIII.	98,0	157,8	1114	1647	— 32,3	213,8	185,9	—	35,4	17,7	—
22	*Marie K.* 40 Jahre, 150 cm	4. IX.	95,5	215,4	1520	1660	— 8,0	270,4	366,8	—	22,0	65,8	—
23	*Georg M.* 24 Jahre, 173 cm	26. IX.	123,0	291,8	2059	2461	— 19,4	360,7	367,4	—	23,9	25,8	—
24	*Gustav T.* 49 Jahre, 156 cm	31. X.	92,5	224,8	1586	1747	— 10,1	269,1	287,1	—	17,9	27,7	—

bei Fettsüchtigen nur den Grundumsatz untersucht, so kann man leicht zu der Ansicht kommen, daß diese Art der Fettleibigkeit die häufigste ist. Denn auch unter dem vorliegenden Material zeigten von 61 Patienten 40 ungefähr normale Grundumsatzwerte. Das Bild ändert sich, wenn man konsequent in allen Fällen von Fettsucht, die zur Untersuchung des respiratorischen Gaswechsels gelangen, auch die Sauerstoffverbrauchssteigerung nach Eiweißzufuhr untersucht. Diese Untersuchung wurde meines Wissens zuerst von *Jaquet* und *Svenson* (40) angewendet. Diese Autoren fanden auch bei den meisten Fettsüchtigen normale oder nicht auffallend erniedrigte Werte des Grundumsatzes, jedoch fanden sie als erste bei Fettsüchtigen als häufiges Symptom, daß die durch Nahrungsaufnahme bedingte Steigerung der Verbrennungsprozesse von bedeutend geringerer Intensität und Dauer als beim normalen Menschen ist.

Fettsüchtige mit vermindertem Grundumsatz und normaler s. d. E. W.

Tabelle X zeigt 24 Fälle mit einem verminderten Grundumsatz und einer normalen s. d. E.W. Die Grundumsatzverminderung beträgt bei diesen Kranken im Minimum 4 Proz., im Maximum 28,5 Proz. Die s. d. E.W. zeigt die gleichen wie bei den Normalfällen gefundenen Werte, nirgends ist die Reaktion auf Eiweißzufuhr erniedrigt, im Gegenteil in sechs Fällen — Nr. 5, 7, 8, 15, 19 und 22 — finden wir exzessiv hohe Steigerung des Sauerstoffverbrauches nach Nahrungszufuhr. Man wird derartige Steigerungen, wenn sie auch nur vereinzelt anzutreffen sind, auch hier wohl als ein paradoxes Verhalten ansehen dürfen, wie ich es bereits bei einzelnen Fällen von Hypogenitalismus zeigen konnte. Der Hypogenitalismus spielt überdies gerade bei diesen Fällen von Fettsucht mit Störungen im respiratorischen Gaswechsel eine nicht geringe Rolle. Viele Frauen dieser Art klagen über Dysmenorrhoe oder Oligomenorrhoe, höhere Grade letzterer Art zeigten sich bei den Fällen Nr. 4, 7, 17 und 23 mit Verminderung des Grundumsatzes auf 16,7, 16, 7,7 und 13,4 Proz. Bei Patientin Nr. 8 mit einer Grundumsatzverminderung von 17,6 Proz. war vor 3 Jahren der Uterus und beide Ovarien exstirpiert worden. Zwei männliche Patienten (Nr. 5 und 12) mit Umsatzverminderungen von 23,6 bzw. 17,1 Proz. gaben anamnestisch Impotenz an.

Die Unterfunktion der Thyreoidea war im Fall 11 mit einer allerdings geringen Umsatzverminderung von 7,4 Proz. die wahrscheinliche Ursache der Fettsucht, da dieselbe hier im Anschluß an eine Strumektomie aufgetreten war. In den Fällen 9, 17 und 24 bestand neben der Fettsucht eine Narkolepsie, die besonders im Falle 9 bereits schwere Formen angenommen hatte. Der Patient schlief wiederholt während des Tages bei der Arbeit ein, nickte häufig während des Sprechens ein usf. Die Untersuchung des respiratorischen Gaswechsels ergab eine Grundumsatzverminderung von 27,1 Proz., worauf eine energische Thyreoidinkur eingeleitet wurde, die neben rascher Gewichtsabnahme auch zu einer Heilung der Narkolepsie führte. Bei Fall 17, bei welchem auch neben Fettsucht eine Narkolepsie geringeren Grades bestand, betrug die Grundumsatzverminderung zur Zeit der Untersuchung nur 5,6 Proz. Diese geringe Umsatzverminderung ist aber in diesem Falle wohl darauf zurückzuführen, daß der Patient bis 14 Tage vor der Gaswechseluntersuchung Jodostarin eingenommen hatte.

Besonderes Interesse verdient auch Nr. 2 dieser Tabelle. Bei dieser 40jährigen Patientin mit 92 kg Körpergewicht, welche vom 23. Dezember

1922 bis 16. Juni 1923 in Beobachtung stand, konnte der Einfluß von Thyreoidin und Hypophysenvorderlappenpräparaten auf Grundumsatz und s.d.E.W. studiert werden. Bei dieser Kranken konnte mit einem Grundumsatz von — 11,9 Proz. bei normaler s.d.E.W. von 18,9 bzw. 27,9 Proz. Sauerstoffverbrauchssteigerung nach Eiweißkost die Fettsucht als thyreogen bedingt bezeichnet werden. (Für Genitalhypofunktion klinisch kein Anhaltspunkt.) Versuchshalber wurden bei dieser Patientin zunächst ab 17. Januar neben täglicher Verabreichung von 0,15 g Thyreoidin *Merck* jeden zweiten Tag drei Tabletten Präphyson (*Passek* und *Wolf*) gegeben. Die am 1. Februar vorgenommene Untersuchung zeigte keine Gewichtsabnahme, der Grundumsatz war auf — 14 Proz. abgesunken, die s.d.E.W. auf 35 Proz. angestiegen. Unter weiterer gleicher Präphysonmedikation, jedoch Steigerung der Thyreoidindosis auf täglich 0,2 g sank das Körpergewicht bis zum 27. Februar um 3 kg ab, jedoch der Grundumsatz war weiter bis auf — 26,5 Proz. abgesunken. Die s.d.E.W. hingegen war sowohl hinsichtlich ihres Wertes nach der ersten Stunde als auch nach 1 ½ Stunden angestiegen. Der Maximalwert betrug 38,3 Proz., war also um 10,4 Proz. höher als der am 23. Dezember erhobene Wert. Korrespondierend damit war der Grundumsatz um 14,6 Proz. abgesunken.

Daß die Präphysonmedikation diesen merkwürdigen und interessanten Einfluß auf Grundumsatz und s.d.E.W. hat, konnte auch die weitere Beobachtung dieses Falles lehren. Vom 27. Februar an wurde bei dieser Kranken die Präphysonmedikation eingestellt und täglich 0,3 g Thyreoidin verabreicht. Hierauf sank das Körpergewicht bis zum 23. März weiter um 1 kg ab, der Grundumsatz wurde vollständig normal, hingegen war die s.d.E.W. wesentlich niedriger geworden und lag mit 5,2, 12,4 und 8,8 Proz. unter den Anfangswerten vom 23. Dezember und blieb um 25,9 Proz. hinter dem Maximalwert, der am 27. Februar beobachtet werden konnte, zurück. Die Patientin nahm nun bis zum 16. Mai Thyreoidin weiter, dann wurde die Medikation ausgesetzt und am 16. Juni wieder der respiratorische Gaswechsel untersucht. Die Patientin hatte inzwischen weitere 3 kg abgenommen, der Grundumsatz war aber 4 Wochen nach Aussetzen der Thyreoidinmedikation wieder auf — 11,3 Proz. abgesunken, die s.d.E.W. begann aber wieder anzusteigen.

Die Beobachtung, daß die Einverleibung von Hypophysenvorderlappenpräparaten ein Absinken der Oxydationen im Ruhe-Nüchternversuch zur Folge hat, konnten auch schon *S. Bernstein* und *W. Falta* (41) machen. Nach intramuskulärer Injektion von 2 bis 5 ccm von Pituitrinum glandulare (Hypophysenvorderlappenpräparat von *Parke-Davis*) fanden diese Autoren sowohl beim Gesunden als auch beim Diabetiker im respiratorischen Stoffwechsel eine wenige Minuten nach der Injektion einsetzende Verminderung der Wärmebildung.

Aus den oben angeführten Versuchen geht hervor, daß auch bei oraler Zufuhr von *Vorderlappenpräparaten* dieses Phänomen auftritt, daß bei andauernder Medikation die Grundumsatz drückende Wirkung der Hypophysenvorderlappenpräparate mehrere Tage anhält, und *daß mit dem Herabgehen der Oxydationen im Ruhe-Nüchternversuch ein Ansteigen der Oxydationen nach Nahrungszufuhr parallel geht.* Weiter zeigte sich, daß die Hypophysenvorderlappenmedikation durch Thyreoidinzufuhr koupiert werden kann. Gleiche Beobachtungen waren auch bei zwei Fällen der folgenden Gruppe zu machen.

Tabelle XI. Fettsüchtige mit normalem G. U. und verminderter s. d. E. W.

Nr.	Name Alter Körperlänge	Datum	Gewicht	Sauerstoffverbrauch im Grundumsatz in ccm pro Min.	Grundumsatz in Calorien	Grundumsatz Normalwert	Abweichung des Grundumsatzes in Proz.	Spezifisch-dynamische Wirkung: Sauerstoffverbrauchssteigerung in ccm nach 60 Min.	in ccm nach 90 Min.	in ccm nach 120 Min.	in Proz nach 60 Min.	in Proz nach 90 Min.	in Proz nach 120 Min.	Bemerkungen
1	*Martha H.* 11 Jahre, 137 cm	26. V. 1922	45,8	208,7	1472	1291	+ 14,0	209,6	229,8	—	0	10,1	—	
2	*Louise S.* 37 Jahre, 163 cm	29. XI.	90,0	252,4	1781	1625	+ 9,5	253,3	293,5	—	1,1	16,3	—	
3	*Lotte G.* 12 Jahre, 149 cm	9. XII.	56,0	217,2	1532	1396	+ 9,7	243,5	248,2	—	12,1	14,2	—	
4	*Luzi G.* 14 Jahre, 154 cm	9. XII.	60,0	222,6	1571	1427	+ 10,0	241,8	253,7	—	8,6	13,9	—	
5	*Paul K.* 40 Jahre, 164 cm	11. XII.	93,0	312,4	2204	1868	+ 17,9	343,4	362,9	—	9,8	16,1	—	
6	*Regine E.* 52 Jahre, 150 cm	23. I. 1923	96,0	241,3	1703	1588	+ 7,2	241,1	276,3	—	0	14,5	—	
		4. II.	96,0	203,8	1438	1588	— 10,4	203,0	235,9	—	0	16,1	—	Präphyson
		14. II.	94,0	185,3	1307	1568	— 19,8	222,3	234,5	—	19,9	26,5	—	„
		7. III.	91,0	221,4	1527	1538	— 0,7	240,1	244,0	—	8,4	10,2	—	
7	*Stella W.* 16 Jahre, 157 cm	14. II.	86,0	232,4	1640	1660	— 1,2	233,2	248,3	—	0	6,4	—	
		14. IV.	82,0	235,9	1664	1620	+ 2,7	268,2	267,3	—	13,6	13,3	—	„
8	*Karoline M.* 39 Jahre, 159 cm	22. II.	79,0	221,5	1560	1503	+ 3,7	257,8	263,1	—	16,6	19,0	—	
		6. III.	78,0	198,4	1400	1493	— 6,2	243,0	250,9	—	22,4	26,4	—	„
		17. III.	78,5	206,5	1456	1498	— 2,2	235,3	271,3	243,0	13,9	31,4	17,6	„
9	*Anna B.* 33 Jahre, 164 cm	10. III.	82,5	247,7	1748	1574	+ 11,0	249,0	294,9	297,1	0	19,0	19,9	
10	*Stella B.* 14 Jahre, 153 cm	10. IV.	57,5	217,7	1536	1376	+ 11,6	236,5	234 5	235 5	8,7	7,7	8,6	
		5. IV.	59,5	220,5	1556	1389	+ 12,0	238,7	239,3	230,4	8,2	8,5	4,5	

11	*Antonie Gr.* 32 Jahre, 160 cm	1922 27. IV.	94,0	248,2	1752	1681	+ 4,2	264,1	278,7	—	+ 6,4	10,7	—	
12	*Theresia K.* 27 Jahre, 154 cm	3. V.	76,5	226,2	1596	1527	+ 4,5	257,4	245,3	—	13,4	8,4	—	
13	*Paul P.* 24 Jahre, 162 cm	7. V.	104,5	284,6	2008	1822	+ 10,0	321,8	324,7	—	13,0	14,0	—	
		11. VI.	108,0	296,5	2092	1857	+ 12,6	321,6	326,3	—	8,4	10,0	—	
14	*Anna S.* 37 Jahre, 157 cm	13. V.	91,5	258,9	1827	1628	+ 15,2	275,8	305,4	—	5,4	18,1	-	
15	*Paula S.* 32 Jahre, 170 cm	28. V.	93,5	269,2	1899	1695	+ 12,0	316,1	306,6	—	17,4	13,9	—	
16	*Gisela Z.* 37 Jahre, 159 cm	1923 15. III.	88,0	232,2	1639	1618	+ 1,3	—	—	—	—	—	—	
		5. VI.	81,0	217,7	1536	1566	— 1,9	238,8	221,8	—	9,7	1,9	—	
17	*Fanny B.* 40 Jahre, 153 cm	13. III.	70,0	232,5	1640	1401	+ 17,0	263,0	278,8	—	13,1	19,9	—	
18	*Anna K.* 19 Jahre, 164 cm	20. VIII.	80,5	218,5	1542	1606	+ 4,0	220,0	208,0	—	θ	θ	—	
19	*Emma M.* 30 Jahre, 158 cm	19. VIII.	67,5	231,4	1632	1450	+ 12,7	262,0	243,0	237,0	13,2	5,0	2,6	
20	*Berta L.* 43 Jahre, 145 cm	23. IX.	73,0	210,5	1485	1415	+ 5,0	234,9	233,5	—	11,5	10,9	—	
21	*Helene H.* 52 Jahre, 152 cm	26. IX.	126,0	280,1	1976	1899	+ 4,2	307,9	301,2	—	9,9	7,5	—	
22	*Anna S.* 18 Jahre, 154 cm	8. X.	71,2	221,2	1560	1430	+ 9,0	212,3	226,7	—	θ	2,8	—	Präphyson
		26. X.	71,2	164,1	1158	1430	— 23,6	233,1	211,2	—	42,0	28,7	—	
23	*Franz P.* 14 Jahre, 150 cm	11. X.	60,7	236,0	1664	1559	+ 6,7	236,5	251 1	—	θ	6,3	—	Seichte Sella turcica
24	*Aloisia S.* 31 Jahre, 159 cm	18. X.	80,8	255,0	1799	1558	+ 15,0	285,6	261,7	—	11,6	θ	—	
25	*Grete R.* 21 Jahre, 157 cm	9. II.	72,0	236,1	1665	1517	+ 9,7	241,4	234,4	—	2,3	θ	—	

Fettsüchtige mit annähernd normalem G. U. und verminderter s. d. E. W.

In dieser Gruppe von Fällen, welche in Tabelle XI zur Darstellung gelangen, finden sich 25 Fälle von Adipositas mit normalem Grundumsatz, jedoch herabgesetzter s. d. E. W. Auffallend ist, daß in dieser Gruppe von Kranken die weiblichen Patienten vorherrschen. Es sind nämlich 22 Patienten weiblichen Geschlechts von 11 bis 25 Jahren und nur 3 Männer im Alter von 14 bis 40 Jahren. Die Werte für den Grundumsatz bewegen sich in dieser Gruppe bei den Frauen zwischen — 1,2 bis + 15,2 Proz., bei den Männern zwischen 6,7 bis + 17,9 Proz. Wir finden in dieser Gruppe von Kranken fast durchweg normale Grundumsatzwerte, ja bei neun Fällen von 25, also in 36 Proz. der Gesamtanzahl, finden wir die Grundumsatzwerte über + 10 Proz., die wir also als leichte Steigerung des Ruhe-Nüchternwertes bezeichnen müssen. Es sind dies Fälle, welche wegen dieses merkwürdigen Verhaltens des Grundumsatzes ja schon vielen Autoren aufgefallen sind und deren Deutung schwer möglich ist, wenn man nicht bei diesen Kranken systematisch auch die Steigerung der Verbrennung nach Nahrungszufuhr untersucht. Unter den bezeichneten 25 Fällen bleibt der Maximalwert der Oxydationssteigerung innerhalb der Untersuchungszeit, also 1½ bis 2 Stunden nach dem Eiweißfrühstück, in sieben Fällen unter 20 Proz., in zehn Fällen unter 15 Proz., in acht Fällen unter 10 Proz., ja bei den letzteren blieb in vier Fällen die Sauerstoffverbrauchssteigerung während der Beobachtungszeit vollständig aus. Ich muß hier das Wort „während der Beobachtungszeit" besonders betonen, denn es ist nicht ausgeschlossen, daß bei einzelnen dieser Patienten die Steigerung der Oxydationen nach Nahrungszufuhr viel später eintritt. Jedoch die große Anzahl des vorliegenden Untersuchungsmaterials, das ja auch den Zweck verfolgt, zu prüfen, ob die Untersuchung der s. d. E. W. auch klinisch von Bedeutung ist, hat gezeigt, daß bei der geschilderten Versuchsanordnung bei Normalen und auch der Mehrzahl der endokrinen Krankheitszustände die Steigerung der Oxydationen innerhalb der ersten 2 Stunden das Maximum erreicht. Wenn diese Methode überhaupt klinisch von Bedeutung sein soll, so darf es nicht notwendig sein, die Untersuchungsdauer über 2 Stunden auszudehnen, denn das ergibt ja schon für jeden untersuchten Fall drei bis fünf Gaswechselversuche an einem Vormittag. Wenn man auch von der dadurch für den Untersucher notwendigen großen Arbeitsleistung absieht, so ist doch diese zu oft an einem Tage bei demselben Patienten durchgeführte Untersuchung des respiratorischen Gaswechsels schließlich lästig und unangenehm. Auch der ruhigste Patient wird eventuell unruhig und nervös, so daß ein absoluter Ruheversuch gar nicht mehr möglich ist, was schließlich zu einer Umsatzsteigerung führen kann, die dann kaum mit Sicherheit auf die Eiweißwirkung zu beziehen wäre.

Auch bei Fällen dieser Gruppe finden wir nicht selten klinisch Unterfunktion der Keimdrüsen. In drei Fällen — Nr. 20, 22 und 23 — war die Fettverteilung dem Typus *Fröhlich* entsprechend. Einer der letzteren, und zwar Nr. 23, der 14jährige *Franz P.* mit hochgradiger Hypoplasie des Genitales und eunuchoiden Skelettproportionen (Körperlänge 150 cm, Oberlänge 70,5 cm, Unterlänge 79,5 cm, Spannweite 152 cm), bei dem die Fettsucht seit dem dritten Lebensjahr besteht, zeigte röntgenologisch (*Kienböck*) eine auffallend kleine und seichte Sella turcica. Wie ich schon früher erwähnte, geht der Röntgenbefund nicht immer mit dem Stoffwechselbefund parallel. Es ist dies ja auch gar nicht zu erwarten. Denn es ist wohl möglich, daß eine Hypophyse, welche keine Veranlassung zu einer

röntgenologisch erkennbaren Veränderung der Sella gibt, in ihrer Funktion gestört ist. Hingegen zeigen, wie sich aus dieser Abhandlung ergibt, röntgenologisch als pathologisch erkannte Hypophysen in den meisten Fällen eine Störung im Ablauf der s.d.E.W. Auch in dem eben besprochenen Falle geht mit der röntgenologisch gefundenen kleinen und seichten Sella turcica und den anderen klinischen Symptomen, welche auf eine hypophysäre Störung hinweisen, eine starke Verminderung der s.d.E.W. parallel, und wir sind daher berechtigt, diese Verminderung auf die Unterfunktion der Hypophyse zu beziehen. In allen Fällen von Fettsucht, bei welchem die s.d.E.W. herabgesetzt ist, einen Hypophysenausfall anzunehmen, wie dies *R. Plaut* tut, ist aber wohl nicht immer zutreffend, wie ich noch an einer Reihe von Fällen der Tabellen XIII bis XV zeigen werde. Für die größere Anzahl von Fällen mit Verminderung der s.d.E.W. ist aber die hypophysäre Genese nicht von der Hand zu weisen. Dies zeigen auch in der besprochenen Gruppe von 25 Fettsüchtigen eine Reihe von Kranken, bei denen die s.d.E.W. durch Verabreichung von Hypophysenvorderlappenpräparaten beeinflußt werden konnte. Dies ließ sich bei den Patienten Nr. 6, 7, 8 und 22 zeigen. Bei Fall 8, einer 39jährigen Patientin mit 79 kg Körpergewicht, bestand am 22. Februar 1923 mit + 3,7 Proz. ein normaler G.U. und eine in geringem Grade herabgesetzte s.d.E.W. mit 16,6 bzw. 19 Proz. Sauerstoffverbrauchssteigerung nach Eiweißkost. Am 6. März nach Verabfolgung von acht Präphysoninjektionen war der Umsatz um 9,9 auf — 6,2 Proz. abgesunken, hingegen die s.d.E.W. sowohl nach der ersten als auch nach 1½ Stunden angestiegen, und zwar im Maximum um 7,4 Proz. Nach weiteren zehn Injektionen zeigte die Patientin am 17. März ungefähr den gleichen Wert für den G.U., hingegen war die s.d.E.W. auf den Maximalwert von 31,4 Proz. angestiegen. Seit Beginn der Vorderlappenmedikation war also die Sauerstoffverbrauchssteigerung nach Eiweißzufuhr um 12,4 Proz. in die Höhe gegangen. Ein gleiches Verhalten zeigte Fall 6, eine 52jährige Patientin mit 96 kg Körpergewicht (Abt. *Donath*). Bei dieser war der Grundumsatz am 20. Januar 1923 mit + 7,2 Proz. als normal zu bezeichnen, die s.d.E.W. war mit 0 bzw. 14,5 Proz. herabgesetzt. Am 4. Februar nach Verabreichung von zehn Präphysoninjektionen sank der G.U. um 17,6 auf — 10,4 Proz. ab. Die s.d.E.W. war aber zunächst nur wenig, auf 16,1 Proz. angestiegen. Am 14. Februar nach Verabfolgung weiterer zehn Injektionen und weiterem Sinken des G.U. auf — 19,8 Proz. war aber die s.d.E.W. auf 19,9 bzw. 26,5 Proz. angestiegen, gegenüber der Untersuchung am 23. Januar war der Maximalwert der s.d.E.W. um 12 Proz. höher. Die Präphysoninjektionen waren weiter bis zum 28. Februar gegeben worden, und am 7. März, also nach einwöchigem Aussetzen der Vorderlappentherapie wurde der respiratorische Gaswechsel abermals untersucht. An diesem Tage war der G.U. auf — 0,7 Proz. angestiegen, war also vollkommen normal geworden, die s.d.E.W. war aber wieder um 16,3 Proz. abgesunken. Während der 45tägigen Beobachtung war das Körpergewicht der Patientin, die im Spital auch eine Diätkur machte, um 5 kg abgesunken.

Ohne Diäteinschränkung konnte ich nur bei einer Patientin mit Präphysontherapie einen Gewichtssturz beobachten. Es ist dies Nr. 7, eine 16jährige Patientin von 86 kg Körpergewicht mit Dys- und Oligomenorrhoe. Diese Patientin zeigte am 14. Februar mit — 1,2 Proz. einen normalen G.U. und eine fast vollständig fehlende s.d.E.W. mit 0 bzw. 6,4 Proz. Sauerstoffverbrauchssteigerung nach Eiweißzufuhr. Nach der zehnten

Präphysoninjektion trat bei der Patientin eine für dieselbe bisher ungewöhnlich starke Menstruation auf, welche seit 11 Monaten ausgeblieben war. Bei der am 14. April nach 25 Präphysoninjektionen vorgenommenen Untersuchung des respiratorischen Gaswechsels hatte die Patientin um 4 kg abgenommen, der G. U. war aber in diesem Falle mit + 2,7 Proz. unverändert geblieben, während die s. d. E.W. auf 13,6 Proz. schon in der ersten Stunde angestiegen war. Es ist gerade dieser Fall, bei dem der Wiedereintritt der Menstruation, Gewichtssturz und Steigerung der s. d. E.W. nach Hypophysenvorderlappentherapie eintrat, von großer experimenteller Bedeutung, da bei diesem Zusammentreffen der genannten Symptome der Erfolg der Hypophysenvorderlappentherapie unzweifelhaft ist. Es ist auch kein Zufall, daß gerade bei dieser Patientin ohne Diätbeschränkung durch diese Medikation ein Gewichtssturz eintrat, denn es ist dies einer der wenigen Fälle, wo eine Steigerung der s. d. E.W. ohne Drückung des G. U. die Folge der Hypophysenvorderlappenmedikation war. Wenn nach Verabreichung von Hypophysenvorderlappen der Grundumsatz stark absinkt, so ist eigentlich das Eintreten eines Gewichtssturzes nicht zu erwarten. Dies zeigt auch Fall 22, eine 18 jährige Patientin von 154 cm Körperlänge und 71,2 kg Körpergewicht (Abt. *Donath*). Die Patientin zeigte am 8. Oktober 1923 mit + 9 Proz. einen normalen Grundumsatz und eine fast vollständig fehlende s. d. E.W., nach 1 Stunde 0 Proz., nach 1½ Stunden 2,8 Proz. Sauerstoffverbrauchssteigerung. Am 26. Oktober, nachdem die Patientin durch 16 Tage täglich fünf Tabletten Präphyson genommen hatte, war der G. U. auf — 23,6 Proz. abgesunken, die s. d. E.W. erreichte 1 Stunde nach Eiweißkost 42 Proz. und nach 1½ Stunden 28,7 Proz. Die Patientin hatte während dieser Zeit an Gewicht nicht abgenommen.

Man wird daher, wenn man bei Fettsüchtigen auf Grund des Ausfalles der s. d. E.W. sich zur Verabfolgung von Hypophysenvorderlappenmedikation entschließt, die Wirkung dieser Therapie im respiratorischen Gaswechsel prüfen müssen und bei starkem Absinken des G. U. keinen Erfolg erwarten können.

Daß andere Medikationen keinen Einfluß auf die s. d. E.W. haben, zeigt z. B. Fall 10. Die 14 jährige Patientin *Stella B.*, 153 cm Körperlänge, 57½ kg, zeigte bei der ersten Untersuchung einen normalen Grundumsatz von + 11,6 Proz. und für die s. d. E.W. folgende Werte: 8,7, 7,7, 8,6 Proz. Nachdem die Patientin durch 18 Tage täglich dreimal drei Tropfen einer 1 proz. Jodkaliumlösung genommen hatte (diese Medikation wurde wegen einer bestehenden Struma eingeleitet), kam sie am 5. Mai wieder zur Untersuchung. Sie zeigte daselbst einen Grundumsatz von + 12 Proz. und für die s. d. E.W. die Werte 8,2, 8,5 und 4,5 Proz. Es zeigt also dieser Fall, daß die Jodmedikation die s. d. E.W. vollkommen unbeeinflußt läßt, während, wie früher gezeigt wurde, die Hormontherapie mit Hypophysenvorderlappenpräparaten einen mächtigen Einfluß auf die s. d. E.W. erkennen läßt.

Fettsüchtige mit vermindertem G. U. und verminderter s. d. E. W.

In Tabelle XII sind sechs Patientinnen mit teils geringradig, teils deutlich vermindertem Grundumsatz und verminderter s. d. E.W. enthalten. Die Grundumsatzverminderung bei diesen Fällen betrug 1,7 bis 11,7 Proz., die Herabsetzung der s. d. E. W. lag in drei Fällen unter 20 Proz., in zwei Fällen unter 15 Proz, und in einem Falle unter 10 Proz. Bei einer Kranken dieser Gruppe, Nr. 3, wurde durch zehn Präphysoninjektionen

weder der Grundumsatz noch die s.d.E.W. beeinflußt; dieser Fall steht allerdings in meinen Versuchsreihen ganz vereinzelt da, und es ist nicht ausgeschlossen, daß in diesem Falle zufällig ein unwirksames Präparat zur Anwendung gelangte. Im Falle 5, einer Patientin mit einer G. U.-Verminderung um 11,7 Proz. konnte durch eine kombinierte Thyreoidin-Ovoglandoltherapie der G. U. um 17,9 Proz. gesteigert werden. Die s. d. E. W. blieb unverändert, das Gewicht war um 8 kg innerhalb 4 Monate gesunken. Sonst bieten die Fälle dieser Gruppe nichts Erwähnenswertes.

Wenn wir also bei einer Reihe von Fettsüchtigen die gleichen Beobachtungen hinsichtlich der s. d. E.W. machen können, wie wir sie bei Patienten beobachteten, bei denen die Erkrankung der Hypophyse feststeht, und wenn wir andererseits sehen, *daß die s.d.E.W. durch Hypophysenvorderlappenmedikation geradezu mit experimenteller Sicherheit gesteigert werden kann*, so sind wir wohl berechtigt, ebenso wie *R. Plaut*, anzunehmen, daß der Hypophyse bei der Stoffwechselsteigerung nach Nahrungszufuhr eine wichtige Funktion zukommt, und sind auch *berechtigt, beim Fehlen oder bei starker Verminderung der s.d.E.W. bei Fettsucht bei normalem G. U. in den meisten Fällen eine hypophysäre Unterfunktion anzunehmen.*

R. Plaut geht aber sicher zu weit, wenn sie auf Grund der Untersuchungen des respiratorischen Gaswechsels alle Fälle von Fettsucht in Mastfettsucht, thyreogen bedingte und hypophysär bedingte Fettsucht einteilen zu können glaubt. Wie wir an der Hand des obigen Materials gesehen haben, ist allerdings die Untersuchung des respiratorischen Gaswechsels vor Einleitung einer Entfettungskur unzweifelhaft ein wichtiger diagnostischer Behelf, der in vielen Fällen den Wegweiser für die einzuschlagende Therapie abgeben wird. Er wird insbesondere verhindern, daß in Fällen endokriner Fettsucht eine kalorisch stark reduzierte Diät versucht wird, die in solchen Fällen, wie *Noorden* zeigen konnte, nicht zum Ziele führt. Andererseits ist es auf Grund der Untersuchung des respiratorischen Gaswechsels möglich, die Thyreoidintherapie und auch die Hypophysentherapie auf die strikt indizierten Fälle zu begrenzen und die Wirksamkeit dieser Präparate zu kontrollieren. Vor allem geht aus obigen Untersuchungen auch deutlich hervor, daß die Hypophysenvorderlappenmedikation ohne Diäteinschränkung nur da zu einem Gewichtssturz führt, wo durch dieses Hormon der G.U. nicht zu stark herabgesetzt wird. Man wird, wie im Fall 7 der Tabelle XI dort eine günstige Wirkung der Hypophysenvorderlappentherapie erwarten müssen, wo nach dieser Medikation die s.d.E.W. ansteigt und der G.U. unverändert bleibt. Hingegen wird es notwendig sein, in den Fällen, wo nach Vorderlappentherapie der G.U. stark heruntergeht, durch wiederholte Untersuchungen des respiratorischen Gaswechsels das richtige Verhältnis von zuzuführendem Thyreoidin und Hypophysenvorderlappen auszubalancieren. Es ist also kein Zweifel, daß gerade bei Fettsüchtigen der Untersuchung der s.d.E.W. neben dem Grundumsatz eine nicht zu unterschätzende Bedeutung zukommt.

Man kann aber nicht annehmen, daß in allen Fällen von Fettsucht mit dieser Untersuchungsmethodik ein promptes und unzweifelhaftes Ergebnis zu erzielen sein wird.

Letzteres wäre der Fall, wenn die s.d.E.W. nur durch die Funktion der Hypophyse beeinflußt würde. Dies ist aber kaum der Fall, wie aus einzelnen Fällen der folgenden Tabellen gezeigt werden soll. Bei Fettsüchtigen ist ja, wie gezeigt wurde, beim Fehlen der s.d.E.W. die hypo-

Tabelle XII. Fettsüchtige mit leicht vermindertem G.U. und verminderter s.d. E.W.

Nr.	Name Alter Körperlänge	Datum	Gewicht	Sauerstoffverbrauch im Grundumsatz in ccm pro Min.	Grundumsatz in Calorien	Grundumsatz Normalwert	Abweichung des Grundumsatzes in Proz.	Spezifisch-dynamische Wirkung: Sauerstoffverbrauchssteigerung in ccm nach 60 Min.	90 Min.	120 Min.	in Proz. nach 60 Min.	90 Min.	120 Min.	Bemerkungen
1	*Bettina L.* 26 Jahre, 153 cm	1923 25. III.	70,6	202,9	1432	1472	— 2,8	232,2	202,6	—	14,3	θ	—	
2	*Emma E.* 56 Jahre, 146 cm	25. III.	77,0	188,0	1327	1375	— 3,6	219,4	205,8	204,1	16,7	9,4	8,5	
3	*Betty V.* 28 Jahre, 154 cm	1. V.	62,5	190,8	1346	1388	— 3,1	217,3	224,2	—	13,8	17,5	θ	
		14. V.	62,5	187,7	1324	1388	— 4,6	215,8	216,0	—	14,9	16,0	—	Präphyson
4	*Hermine H.* 51 Jahre, 146 cm	15. V.	107,5	236,2	1666	1659	— 1,7	275,3	250,8	—	16,5	6,1	—	
5	*Hedwig K.* 37 Jahre, 165 cm	31. V.	86,0	202,8	1431	1590	— 11,7	202,8	230,9	—	θ	13,4	—	
		22. XI.	78,0	227,3	1604	1510	+ 6,2	234,9	251,4	—	3,3	10,9	—	0,3 Thyreoidin und 3 Tab. Ovoglandol täglich durch 4 Mon.
6	*Rosa Sch.* 31 Jahre, 157 cm	5. VI.	86,5	222,3	1568	1608	— 2,6	239,6	231,0	—	7,7	3,9	—	

Tabelle XIII. Verschiedene Fälle mit verminderter s.d. E.W.

Nr.	Name Alter Körperlänge	Datum	Diagnose	Gewicht	Sauerstoffverbrauch im Grundumsatz in ccm pro Min.	Grundumsatz in Calorien	Grundumsatz Normalwert	Abweichung des Grundumsatzes in Proz.	Spezifisch-dynamische Wirkung: Sauerstoffverbrauchssteigerung in ccm nach 60 Min.	90 Min.	120 Min.	in Proz. nach 60 Min.	90 Min.	120 Min.
1	*Anna Ch.* 41 Jahre, 151 cm	13. IV.	Hypertonie	57,0	304,1	2146	1269	+ 68,2	312,6	330,3	—	2,7	8,6	—
2	*Lotte Sch.* 28 Jahre, 156 cm	2. V.	Myasthenie	57,5	202,1	1426	1344	+ 6,1	218,0	227,1	233,4	2,7	12,3	15,4
3	*Josefine H.* 28 Jahre, 165 cm	11. V.	*Raynaud*sche Krankheit	57,0	211,9	1495	1355	+ 9,6	231,1	230,3	—	9,0	8,7	—
4	*Hermann K.* 22 Jahre, 171 cm	22. VI.	*Raynaud*sche Krankheit	70,5	246,7	1741	1743	θ	241,2	266,5	—	θ	8,0	—
5	*Rosa K.* 33 Jahre, 157 cm	5. X.	Sklerodermie	54,8	234	1652	1298	+ 27,2	261,3	254	—	11,6	8,5	—
6	*Marie K.* 37 Jahre, 165 cm	7. XII.	Sklerodermie	84	233,0	1651	1578	+ 5,0	227,1	252,0	—	θ	7,0	—

physäre Genese wahrscheinlich. Hingegen kann ich in den folgenden Tabellen Beispiele zeigen, bei welchen eine direkte endokrine Ursache der Verminderung der s. d. E. W. im allgemeinen und der Hypophyse im besonderen unwahrscheinlich ist.

Verschiedene Fälle mit verminderter s.d.E.W.

Tabelle XIII zeigt sechs solcher Fälle, bei welchen die s.d.E.W. deutlich herabgesetzt ist, bei welchen natürlich die korrelative Erkrankung der Hypophyse theoretisch nicht auszuschließen ist, die Erkrankung aber primär nicht auf eine hypophysäre Ursache bezogen werden kann. Zunächst Fall 1, eine 41jährige Patientin mit einer genuinen Hypertonie. Diese Patientin zeigt allerdings eine starke Steigerung des G.U. mit + 68 Proz., wie dies *J. Mannaberg* (42) bei der Hochdrucktachykardie an 12 Fällen bereits beschrieben hat, bei welchen ich den respiratorischen Gaswechsel untersucht hatte (diese Untersuchungen wurden inzwischen an einem größeren Material fortgesetzt, worüber demnächst berichtet werden wird). Die bei dem in Rede stehenden Falle gefundene Steigerung des Grundumsatzes kann allerdings kausal mit einer Verminderung der s.d.E.W. zusammenhängen. Denn wenn auch bei Hyperthyreosen, wie ich zeigen konnte, die s.d.E.W. im allgemeinen normal gefunden wird, so führt andererseits häufig die therapeutische Zufuhr von Thyreoideahormon zu einer Verminderung der Sauerstoffverbrauchssteigerung nach Eiweißzufuhr. Es kann hier also der hohe G.U. eine Kompensation der niedrigen Hypophysenwirkung sein oder umgekehrt. Über die Beziehung der Hypophyse zum Kreislauf hat *Cyon* (43) Untersuchungen angestellt. Durch mechanische oder elektrische Reizung der Hypophyse fand er eine Verstärkung der Herzschläge und eine Verlangsamung ihrer Frequenz. Hingegen fand er bei Eröffnung der Hypophysenhöhle beim Hund eine bedeutende Beschleunigung der Herztätigkeit analog der, wie sie nach Durchschneidung der Vagi auftritt. Nach *Cyons* Theorie werden die Vagi bei jeder intrakraniellen Drucksteigerung erregt. Durch letztere werde die Hypophyse gereizt, von wo es zur reflektorischen Reizung der Vagi komme. *Cyon* ist der Ansicht, daß Änderungen des Vagustonus, welche durch den intrakraniellen Druck bedingt sind, auf die Hypophyse zurückzuführen sind. Da ich, wie in einer späteren Mitteilung gezeigt werden wird, Steigerungen des Grundumsatzes bei Hypertonie nicht nur bei Tachykardien, sondern auch bei langsamer Herzschlagfolge fand, so könnte ja nach der Theorie *Cyons* die Beteiligung der Hypophyse auch bei dem oben angegebenen Falle zutreffen. Jedoch die immerhin noch recht anfechtbare Theorie *Cyons* berechtigt uns doch nicht, einen derartigen Fall mit Sicherheit auf Grund des Ausfalls der Untersuchung des respiratorischen Gaswechsels als hypophysär bedingt zu bezeichnen. Wir müssen hingegen vorläufig die hypophysäre Genese bezweifeln. Aber noch schwerer zu deuten ist die Verminderung der s.d.E.W. bei den anderen vier Fällen der Tabelle XIII, wenn man diese Reaktion der Nahrungszufuhr auf den Stoffwechsel nach *Plauts* Ansicht nur direkt mit der Hypophyse in Beziehung bringen will. Fall 2 ist eine 28jährige Patientin der Abteilung *Redlich*, welche an Myasthenie litt. Die Patientin zeigte einen normalen Grundumsatz von + 6,1 Proz. und eine deutlich verminderte s.d.E.W. von 2,7, 12,3 und 15,4 Proz. Sauerstoffverbrauchssteigerung. Es finden sich in der Literatur zwar vereinzelte Angaben über Kombination der Myasthenie mit Hypogenitalismus. So

z. B. bei *Curschmann* und *Hedinger* (zitiert nach *H. Oppenheim*). *Dellile-Vincent* wollen in einem Falle vom Myasthenie durch Behandlung mit Hypophysis- und Ovarialpräparaten eine weitgehende Besserung erzielt haben. *Lundberg* (44) hat die Myasthenie auf eine Erkrankung der Epithelkörperchen bezogen. *W. Löffler* (45) hat in einem Falle von Myasthenia gravis den G. U. untersucht und fand ebenso wie ich in obigem Falle einen normalen Wert. Die s.d.E.W. hat *Löffler* aber nicht untersucht. Wenn auch bei der Myasthenie, wie aus den Angaben der zitierten Autoren hervorgeht, die endokrine Beziehung in Erwägung gezogen wurde, so kann man doch nicht bei einer Erkrankung, deren Ätiologie noch so umstritten ist, eine Funktionsstörung endokriner Drüsen im allgemeinen oder der Hypophyse im besonderen mit der Wahrscheinlichkeit annehmen, daß die Verminderung der s.d.E.W. bei der Myasthenie auch als Beweis der hypophysären Ursache dieser Stoffwechselstörung anzunehmen wäre. Wenn wir nun in Tabelle XIII außerdem zwei Fälle von Raynaud und zwei Fälle von Sklerodermie mit starker Verminderung der s.d.E.W. finden, so glaube ich damit auch zeigen zu können, auf welchem Wege die s.d.E.W. hinsichtlich ihres quantitativen Ausfalls beeinflußt werden kann. Die beiden Fälle von Raynaud sind die 28jährige *Josefine H.*, Abteilung *G. Singer*, und der 22jährige *Hermann K.* (*E. Pulay*); beide Fälle zeigten einen normalen G.U. und eine stark herabgesetzte s. d. E. W. Maximalwert der Sauerstoffverbrauchssteigerung bei dem einen Falle 9 Proz., bei dem anderen 8 Proz. Es kann nicht leicht als Zufall aufgefaßt werden, daß diese beiden gleichen Krankheitsfälle von zwei Personen verschiedenen Geschlechts einen ganz gleichen pathologischen Verlauf im respiratorischen Gaswechsel zeigen.

Die Ätiologie der *Raynaud*schen Krankheit ist bis heute keineswegs geklärt, und es wäre daher im Rahmen dieser Abhandlung ein müßiges Beginnen, darauf näher eingehen zu wollen. Nur das Wichtigste sei hier mitgeteilt. Von *Raynaud* (46) selbst wurde diese Krankheit als symmetrische Gangrän bezeichnet und wird häufig auf eine hereditäre Disposition in Form einer allgemeinen neuropathischen Belastung zurückgeführt. Über den Beginn der Erkrankung im Anschluß an alle möglichen Infektionskrankheiten und über das korrelative Auftreten der *Raynaud*schen Krankheit mit verschiedenen anderen Krankheiten wird von vielen Autoren berichtet [siehe die Monographie von *R. Cassirer* (47)].

Nach *Cassirer* kann in den bisherigen pathologischen Befunden eine ausreichende Erklärung für das gesamte Krankheitsbild der *Raynaud*schen Krankheit nicht gefunden werden. Die verschiedensten hervorstechendsten Krankheitssymptome sind aber unzweifelhaft auf eine Alteration des vegetativen Nervensystems zu beziehen, und es sind wahrscheinlich die der Vasokonstriktion dienenden Bahnen und Zentren, diejenigen also, die das sympathische System in engerem Sinne zusammensetzten, welche den locus morbi darstellen. Es ist natürlich nicht ausgeschlossen, daß über das vegetative System, aber nicht primär die endokrinen Drüsen auch bei dieser Krankheit eine Rolle spielen. *Möbius, Leopold Lewy* und *v. Rothschild* (zitiert nach *Cassirer*) haben die *Raynaud*sche Krankheit mit dem Morbus Basedow kombiniert gefunden. Dies ist in den von mir untersuchten zwei Fällen sicher nicht der Fall, da ja der G.U. bei diesen Kranken normal gefunden wurde und jede Hyperthyreose unzweifelhaft sich in einer Steigerung desselben früher zu erkennen gibt als andere klinische Erscheinungen einer Hyperthyreose sich bemerkbar machen. *Cassirer* faßt die Frage der Beziehung der *Raynaud*schen Krankheit zum endokrinen System in die

Worte zusammen, daß von dem Nachweis einer einheitlichen Störung irgend einer Drüse mit innerer Sekretion bei dieser Erkrankung nicht die Rede sein kann.

Anschließend an die *Raynaud*sche Erkrankung sei noch ein Fall von Sklerodermie besprochen, einer Erkrankung, welche als vasomotorisch-trophische Neurose den gerade früher besprochenen Fällen von *Raynaud* nahesteht. In ganz charakteristischer Weise finden wir auch bei dieser Erkrankung die s.d.E.W. deutlich herabgesetzt. Es handelt sich im Fall 5 um eine 33jährige Patientin (Abt. *Ehrmann* und *Pal*), mit einem G.U. von + 27,2 Proz., bei der die Zunahme der Oxydationen nach Eiweißkost 11,6 bzw. 8,5 Proz. beträgt. Fall 6 ist eine 37jährige Patientin der Abt. *E. Königstein* mit einem G. U. von + 5 Proz. und einer s. d. E. W. von θ bzw. 7,9 Proz.

Auch bei der Sklerodermie wurde von einzelnen Autoren das Vorkommen einer Kombination mit Morbus Basedow beschrieben. Wenn aber *Cassirer* hervorhebt, daß unter vielen Hunderten von Fällen von Sklerodermie, die in der Literatur beschrieben sind, kaum 25 mit Basedow vergesellschaftet sind, so fällt es wohl schwer, den Basedow als die primäre Erkrankung aufzufassen, auf deren Basis sich die Sklerodermie entwickelte. Vereinzelt ist ferner der Befund von *Roux* und *Lafont* über eine Erkrankung der Hypophyse bei Sklerodermie; im Zusammenhang mit dem Befund letzterer Autoren sei allerdings auch auf eine Mitteilung von *G. Izar* (48) hingewiesen, der bei einem 7jährigen Mädchen mit ausgedehnten Zeichen einer Sklerodermie durch Behandlung mit Hypophysin und Pituitrininjektionen eine vollständige Heilung erzielen konnte. Wenn wir auch derartige therapeutische Erfolge nicht übersehen dürfen, so muß bei den vasomotorischen Neurosen erwähnt werden, daß gerade in letzter Zeit bei diesen Erkrankungen auf ganz anderem Wege Heilerfolge erzielt werden konnten. *F. Brünning* und *E. Forster* (49) haben anschließend an die Mitteilung von *Leriche* und *Brünning*, daß die nach Nervenverletzungen auftretenden vasomotorischen Störungen als Folge eines Reizzustandes im sympathischen Nervensystem anzusehen sind und daß nach Beseitigung bzw. Ausschaltung des den Reiz auslösenden Momentes durch Resektion des Neuroms bzw. durch periarterielle Sympathektomie Heilungen erzielt werden können, diese Operationsmethodik auch für vasomotorisch-trophische Neurosen anderer Genese (Raynaud, Akroparästhesie, Erythromelalgie, Sklerodermie usw.) in Vorschlag gebracht. *Brünning* operierte nun einen Fall von Raynaud mit glänzendem Erfolg. Über einen gleichen Heilerfolg bei *Raynaud*scher Erkrankung durch periarterielle Sympathektomie berichtete auch *Kümell* (50) im ärztlichen Verein in Hamburg am 20. Juni 1922. Mit diesen Operationserfolgen findet die Theorie einiger Autoren, daß die vasomotorischen Neurosen auf einer Affektion des Sympathikus bzw. einer Alteration des vegetativen Systems beruhen, eine wichtige Stütze.

Andererseits haben die Untersuchungen zahlreicher Autoren, insbesondere *Asher* und *Flack*, zeigen können, daß die innersekretorischen Drüsen in ihrer Funktion durch das vegetative System beeinflußt werden. Wenn daher, wie ich in den Fällen der Tabelle XIII zeigen konnte, bei Krankheitszuständen, bei welchen eine direkte endokrine Störung im allgemeinen und eine hypophysäre Unterfunktion im besonderen keineswegs mit Sicherheit angenommen werden konnte, eine deutliche Verminderung der s.d.E.W. sich zeigt, und wenn gerade bei diesen Krankheiten ein pathologischer Reizzustand des vegetativen Systems besteht, so ist es wohl naheliegend,

wenn wir annehmen, *daß der durch Eiweißnahrung erfolgende Aminosäurereiz, zum mindesten in einem Teil der Fälle, zunächst auf das vegetative System einwirkt.* Ob das autonome Nervensystem, das ja nicht nur zentrifugale, sondern auch zentripetale Fasern führt, über deren Verlauf und Bedeutung wir allerdings noch nicht genau orientiert sind, peripher durch die Aminosäuren gereizt wird und ob diese Reize durch die zentripetalen Fasern dieses Systems weitergeleitet auf die endokrinen Drüsen wirken, oder ob umgekehrt der Aminosäurenreiz zunächst zentral angreift, läßt sich ja nicht so ohne weiteres theoretisch entscheiden. Wenn wir die Einwirkung der Aminosäuren auf das autonome System in Erwägung ziehen, so müßten wir wohl auch an eine eventuell primäre Reizung des Zwischenhirnes denken, von welchem ja *Isenschmid* und *Krehl* (51) zeigen konnten, daß Gefäß- und Stoffwechselwirkungen, die mit der autonomen Innervation zusammenhängen und der Aufrechterhaltung der Körperwärme dienen, von zentralen und medialen Teilen des Zwischenhirnes in Gang gesetzt werden.

Die Verhältnisse sind also überaus kompliziert und derzeit noch schwer zu deuten; jedenfalls kann ich mich der Theorie *R. Plauts*, daß die Störung im Ablauf der s. d. E.W. stets auf eine primäre Erkrankung der Hypophyse zurückzuführen ist, nicht anschließen.

Die Entscheidung, in welcher Weise und in welchem Maße die s. d. E.W. durch das autonome System direkt beeinflußt wird, werden vielleicht Untersuchungen über die Änderung der s. d. E.W. unter experimenteller Beeinflussung des vegetativen Nervensystems, mit welchen Untersuchungen ich derzeit beschäftigt bin, bringen können.

Jedenfalls kann heute schon auf Grund der vorliegenden Untersuchungen dieses Krankenmaterials gesagt werden, daß *pathologische Veränderungen im autonomen Nervensystem auch bei normaler Hypophyse eine Störung im Ablauf der spezifisch-dynamischen Eiweißwirkung zur Folge haben können.*

Diese Ansicht wird auch durch die folgenden Fälle der Tabellen XIV und XV, welche nur schwer unter die Genese einer primären Hypophysenstörung einzureihen sind und welche doch eine stark herabgesetzte s. d. E.W. zeigen, gestützt, und es lassen sich die noch zu besprechenden Fälle unter Festhaltung dieser Theorie wohl leichter subsumieren.

Psychosen und Neurosen.

Tabelle XIV zeigt unter 13 Fällen[1]) von Psychosen und Neurosen (die Diagnosen werden bei den einzelnen Fällen in der Tabelle angeführt), zugewiesen von *P. Federn*, Abteilung *Redlich*, und *B. Drastich*, *sieben Fälle mit einer Verminderung* des Grundumsatzes. Es sind dies meist Fälle von Melancholie, welche mit einer Keimdrüsenunterfunktion (eventuell präklimakterisch) vergesellschaftet gefunden wurden. Bei diesen sieben Fällen war die s. d. E.W. normal. Hingegen fand sich eine starke Verminderung der s. d. E.W. in drei Fällen. Bei Fall 4, einem 42jährigen Patienten mit zirkulärem Irresein in der depressiven Phase, mit einem G. U. von — 3,8 Proz. fand sich eine s. d. E.W. von 8,4, 10,8 und 13,6 Proz. Oxydationssteigerung nach Eiweißkost. Bei Fall 5, einer 24jährigen Patientin mit Epilepsie, G. U. normal, erreichte die s. d. E.W. als Maximalwert nur 3,5 Proz. Ebenso blieb bei Fall 11, einem 21jährigen Patienten mit Melancholie die s. d. E.W. mit 5,7 bzw. 8,7 Proz. tief unter der Norm. Es ist wohl kaum möglich.

[1]) Zwei dieser Fälle finden sich in Tabelle IV.

Tabelle XIV. Psychosen und Neurosen.

Nr.	Name, Alter, Körperlänge	Datum	Diagnose	Gewicht	Sauerstoffverbrauch im Grundumsatz in ccm pro Min.	Grundumsatz in Calorien	Grundumsatz Normalwert	Abweichung des Grundumsatzes in Proz.	Spezifisch-dynamische Wirkung: Sauerstoffverbrauchssteigerung in ccm nach Min. 60	90	120	in Proz. nach Min. 60	90	120	Bemerkung.
1	*Hans V.* 45 Jahre, 189 cm	1923 25. II.	Depression, Impotenz	102,0	211,5	1493	2070	— 38,7	289,9	276,3	—	37,1	30,6	—	
2	*Siegmund Z.* 53 Jahre, 162 cm	3. III.	Melancholie cyclica	78,0	204,9	1446	1551	— 7,2	246,7	265,4	276,4	20,4	29,5	34,9	
		13. VI.		76,0	215,3	1519	1539	— 1,3	247,2	230,0	—	14,9	6,9	—	Thyreoidintherapie
3	*Erna L.* 50 Jahre. 150 cm	27. III.	Depression, Melancholie	65,0	164,4	1167	1302	— 11,6	230,8	254,0	—	39,5	54,7	—	
4	*Max R.* 42 Jahre, 177 cm	7. IV.	Zirkuläres Irresein	98,5	272,6	1923	2000	— 3,8	295,6	300,1	309,8	8,4	10,8	13,6	
5	*Grete B.* 24 Jahre, 150 cm	19. IV.	Epilepsie	64,5	215,1	1517	1420	+ 6,7	222,7	208,8	—	3,5	θ	—	
6	*Bernhard L.* 30 Jahre, 178 cm	17. IV.	Impotenz, Depression	72,0	226,1	1595	1703	— 6,8	293,0	280,8	279,7	29,6	24,1	23,7	
7	*Lina H.* 48 Jahre, 163 cm	21. IV.	Kastration vor 12 Jahren Melancholie	63,5	184,6	1302	1403	— 7,7	220,4	243,6	—	19,3	31,9	—	
8	*Marie R.* 47 Jahre, 153 cm	19. II.	Melancholie	54,5	151,5	1069	1220	— 14,0	162,8	181,4	—	7,4	19,7	—	
		24. V.		51,0	189,8	1185	1339	+ 12,9	184,2	202,9	—	θ	6,9	—	Thyreoidintherapie
9	*Richard K.* 24 Jahre, 180 cm	27. IV.	Vasomotorische Neurose	84,0	282,7	1995	1918	+ 4,0	331,6	309,2	—	17,3	12,5	—	
10	*Ernst L.* 28 Jahre, 173 cm	1. VI.	Melancholie	70,0	251,4	1774	1664	+ 6,0	290,5	268,0	—	15,5	6,6	—	
11	*Hermann F.* 21 Jahre, 179 cm	2. VI.	Melancholie	72,5	267,9	1890	1776	+ 6,4	283,2	291,4	—	5,7	8,7	—	

Tabelle XV. Hautkranke.

Nr.	Name Alter Körperlänge	Datum	Diagnose	Gewicht	Sauerstoffverbrauch im Grundumsatz in ccm pro Min.	Grundumsatz in Calorien	Grundumsatz Normalwert	Abweichung des Grundumsatzes in Proz.	Spezifisch-dynamische Wirkung: Sauerstoffverbrauchssteigerung in ccm nach			in Proz. nach		
									60 Min.	90 Min.	120 Min.	60 Min.	90 Min.	120 Min.
1	*Sophie F.* 19 Jahre, 156 cm	1923 20. II.	Seborrhoea oleosa	63,8	263,5	1859	1446	+ 28,8	266,8	289,2	—	0	9,7	—
2	*Marie L.* 26 Jahre, 150 cm	3. III.	Seborrhoe acne vulgaris	51,0	180,6	1274	1284	0	175,9	2082	—	0	15,3	—
3	*Friederike V.* 23 Jahre, 159 cm	20. III.	Alopecia totalis	53,2	189,9	1340	1332	0	197,7	220,1	203,7	4,1	15,9	7,2
4	*Stella G.* 24 Jahre, 165 cm	27. III.	Hypertrichosis genitalhypoplasie	71,0	205,0	1447	1508	— 4,3	215,8	235,6	—	5,2	14,9	—
5	*Laura M.* 30 Jahre, 160 cm	25. IV.	Defluvium capilitii	65,0	218,6	1543	1414	+ 7,0	224,3	231,0	—	2,6	5,7	—

bei allen diesen Fällen als Ursache der Verminderung der s. d. E. W. eine primäre Hypophysenerkrankung oder auch nur eine zufällig korrelative Erkrankung dieses Organes anzunehmen. Jedoch lassen sich diese Fälle wohl ungezwungen unter der Annahme einer pathologischen Einstellung des vegetativen Systems, die sich in einer veränderten Reaktion auf Eiweißnahrung äußert, vereinen.

Hautkranke.

Dasselbe gilt, wenn wir unter 29 untersuchten Hautkranken (*E. Pulay*) in fünf Fällen, welche in Tabelle XV zur Darstellung gelangen, starke Verminderungen der s.d.E.W. beobachten können. In einem dieser Fälle, und zwar im Fall 1, einer 19jährigen Patientin mit Seborrhöa oleosa, finden wir allerdings einen gesteigerten G.U. von + 28,8 Proz., dem eine s. d. E.W. von 0 bzw. 9,7 Proz. gegenübersteht. Ferner finden wir im Fall 4, einer 24jährigen Patientin mit Hypertrichosis mit einem G. U. von — 4,3 Proz., eine Patientin mit einer Genitalhypoplasie (Doz. *Blau*), zwei Fälle also, bei denen eine endokrine Erkrankung vorliegt. In den drei anderen Fällen (2, 3, 5) mit normalem G.U. und stark verminderter s. d. E. W., darunter im Fall 5, einer 30jährigen Patientin mit Defluvium capilitii, mit dem erreichten Höchstwert für die s.d.E.W. von nur 5,7 Proz., wäre die Annahme einer endokrinen Störung kaum zu vertreten. Wenn es auch unzweifelhaft ist, daß viele Hautkrankheiten mit Störungen im endokrinen System in Verbindung gebracht werden können, so ist es aber gerade für diese Krankheiten nicht von der Hand zu weisen, daß auch bei ihnen das vegetative System eine Rolle spielt.

Zusammenfassung.

Aus den vorliegenden Untersuchungen ergibt sich daher folgendes:

1. Die spezifisch-dynamische Eiweißwirkung äußert sich nach Zufuhr von 200 g gebratenem Fleisch und 100 g Brot in einer Steigerung des Sauerstoffverbrauchs um etwa 30 Proz. gegenüber dem im Ruhe-Nüchternversuch; die höchste Steigerung wird meistens nach 1 bis 1½ Stunden gefunden. Abweichungen von diesem Werte um 10 Proz. nach unten oder oben (20- bis 40proz. Steigerung) sind als noch in den Bereich der Norm liegend aufzufassen.

2. Die s. d. E.W. ist bei demselben Individuum auch bei Untersuchung nach mehrwöchigen und mehrmonatigen Intervallen konstant.

3. Verminderung bis zu fast vollständigem Fehlen der s. d. E.W. findet sich a) bei Kranken mit sichergestellter Erkrankung der Hypophyse (bei hypophysären Zwergen, einem Falle von Hypophysentumor), b) bei Fettsucht mit dem Verdacht auf endokrine, und zwar hauptsächlich hypophysäre Genese, c) bei Fällen, die mit der Funktion des autonomen Systems zusammenhängen (vasomotorisch-trophischen Neurosen, Raynaud, Sklerodermie).

4. Die s. d. E.W. kann durch Zufuhr von Hypophysenvorderlappenpräparaten gesteigert werden; parallel damit geht aber in den meisten Fällen eine Drückung des Grundumsatzes.

5. Änderungen im Ablauf der spezifisch-dynamischen Eiweißwirkung sind daher ein Zeichen a) einer primären Hypophysenerkrankung, b) einer pathologischen Einstellung des autonomen Systems; denn eine Reihe von Beobachtungen deutet darauf hin, daß die s. d. E.W. mit der Einstellung des autonomen Nervensystems im Zusammenhang steht. Wo und wodurch dabei der Einfluß auf das autonome Nervensystem zustande kommt, wird die Untersuchung weiterer Fälle zu klären suchen.

Literatur.

1) *D. Du Bois* und *E. F. Du Bois*, Arch. f. int. Med. **17**, 1916. — 2) *Hösslin*, Du Bois Arch. 1888. — 3) *Zuntz*, Pflügers Arch. **95**, 1903. — 4) *Magnus-Levy*, Noordens Handb. d. Path. d. Stoffwechsels. — 5) *Benedikt*, Journ. of biol. Chem. **20**, 1915. — 6) *Harris* und *Benedikt*, A biom. study of basal metabolim. Carnegie Inst. Publ. **279**, 1919. — 7) *Pfaundler*, Zeitschr. f. Kinderheilk. **14**, 1916. — 8) *Lavoisier*, Oevres Paris **2**, 1862. — 9) *Bidder* und *Schmidt*, Die Verdauungssäfte und der Stoffwechsel 1852. — 10) *Pettenkofer* und *Voit*, Zeitschr. f. Biol. **80**, 1891. — 11) *Speck*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmak. **2**, 1879. — 12) *Frederiqu*, Arch. de Biol. **8**, 1882. — 13) *Magnus-Levy*, Pflügers Arch. **55**, 1894. — 14) *Rubner*, Die Gesetze des Energieverbrauches bei der Ernährung. Deutike 1902. — 15) *Zuntz*, Gaswechsel und Energie des Radfahrers. Berlin 1899. — 16) *Benedikt* und *Carpenter*, zitiert nach *Grafe*, Die Path. und Phys. des Gesamtstoffwechsels 1923. — 17) *Grafe*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **118**, 1916. — 18) *Johannsson*, Skand. Arch. **21**, 1918. — 19) *Gigon*, Pflügers Arch. **140**, 1911. — 20) *Durig*,

diese Zeitschr. **50**, 1913. — 21) *Löwy*, Pflügers Arch. **43**, 1888. — 22) *Benedikt* und *Emmes*, Amer. Journ. of Phys. **21**, 1912. — 23) *Tangl*, diese Zeitschr. **34**, 1911. — 24) *Lusk*, Journ. of biol. Chem. **13**, 1912. — 25) *Schöpp*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **110**, 1913. — 26) *Arist-Kanitz*, Temperatur und Lebensvorgänge. Berlin, Verlag Bornträger. — 27) *Krogh*, Wien. klin. Wochenschr. **18**, 1922. — 28) *Liebesny*, Med. Klin. **20**, 1922. — 29) *Leimdörfer*, diese Zeitschr. **133**, 1922. — 30) *Zuntz* und *Mehring*, Pflügers Arch. **32**, 1883. — 31) *Pflüger*, Arch. f. d. ges. Physiol. **10**, 1875. — 32) *Weichardt*, Münch. med. Wochenschr. 1918. — 33) *Starkenstein*, ebendaselbst 1919. — 34) *R. Plaut*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **139**, 1922. — 35) *Weiss* und *Adler*, Klin. Wochenschr. **32**, 1922. — 36) *Magnus-Levy*, Zeitschr. f. klin. Med. **60**, 1906. — 37) *Boothby*, Journ. Am. med. assoc. **77**, 1921. — 38) *Salomon*, Berl. klin. Wochenschr. **24**, 1904. — 39) *J. Bauer*, Konstitutionelle Disposition zu inneren Krankheiten. Berlin 1921. — 40) *Jaquet* und *Svenson*, Zeitschr. f. klin. Med. **41**, 1900. — 41) *Bernstein* und *Falta*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **125** u. **127**, 1918. — 42) *Mannaberg*, Wien. Arch. f. innere Med. 1923. — 43) *Cyon*, Arch. f. d. ges. Physiol. **71** u. **73**, 1898. — 44) *Lundberg*, Deutsch. Zeitschr. f. Nervenh. **27**, 1904. — 45) *Löffler*, Zeitschr. f. klin. Med. **137**, 1919. — 46) *Raynaud*, De l'asphyxie locale symetrique des extremites 1862. — 47) *Cassirer*, Levandovskys Handb. d. Neurol. **5**, 1914. — 48) *Izar*, Rif. med. **36**, 1920, zitiert nach *Rona* **3**, 490, 1921. — 49) *Brünning* und *Forster*, Zentralbl. f. Chirurgie **49**, 1922. — 50) *Kümmel*, Zentralbl. f. d. ges. Neurol. u. Psychiat. **30**, 1918. — 51) *Isenschmid* und *Krehl*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **70**, 1912.

Die Wirkung von „Alkaloiden“ auf die Permeabilität.

Bemerkung zu der Arbeit von *A. Brinkman* und *A. v. Szent-György*[1]).

Von

Wolfgang Heubner (Göttingen).

(Eingegangen am 19. November 1923.)

Nachdem ich erst jetzt auf die unten zitierte Arbeit von *Brinkman* und *v. Szent-György* aufmerksam geworden bin, möchte ich zu einem ihrer Befunde Stellung nehmen, nämlich zu dem auffallenden Gegensatz zwischen den nah verwandten Alkaloiden *Morphin* und *Kodein* in ihrem Verhalten gegenüber Kollodiumfiltern: „Morphin macht das Filter für Hämoglobinlösung permeabel, Kodein erwies sich inaktiv und hatte keinen Einfluß auf das Filter“. Dies Ergebnis stützt sich auf Versuche mit m/100 Lösungen der „Salze der Alkaloide“, die dann durch Zusatz einer „stärkeren“ sekundären Natriumphosphatlösung gegen Neutralrot neutralisiert waren.

Mir scheint nicht unwichtig, daß *H. Rhode*[2]) in unserem Institut einen analogen frappanten Gegensatz für die *hämolytische* Wirkung von „Morphin“ und „Kodein“ fand, der sich bei näherer Untersuchung jedoch im wesentlichen als ein Unterschied zwischen dem *Chlorid* des Morphins und dem *Phosphat* des Kodeins entpuppte. Die Parallele zwischen „Hämolyse“ und „Durchlässigkeitsvermehrung einer Membran für Hämoglobin“ ist zu aufdringlich, als daß nicht die Frage aufgeworfen werden müßte, wie denn die zweitgenannte Erscheinung durch die Anionen beeinflußt wird. Es ist doch gewiß kein fernliegender Gedanke, daß Aufladung der Porenwände durch Adsorption von Ionen

1) Diese Zeitschr. **139**, 270.

2) Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **91**, 186, 1921; diese Zeitschr. **131**. 560, 1922.

eine Rolle spielt und daß dabei eine Konkurrenz zwischen Alkaloidkation und -anion auftreten kann. Bestätigt es sich, daß die Autoren mit dem gebräuchlichen Kodeinphosphat gearbeitet haben und entsprechende Versuche mit Kodeinchlorid anders ausfallen, so werden sie vielleicht auch geneigt sein, den Satz zurückzunehmen, der in *dieser* Formulierung doch nicht ganz zutrifft: „Bekanntlich ist von diesen chemisch so nahe verwandten Stoffen der eine, das Morphin, biologisch in sehr hohem Maße aktiv, der andere, das Kodein, biologisch relativ inaktiv“. In der Zusammenfassung steht sogar: „das biologisch *unwirksame* Kodein“!

Über die Wirkung der Amine auf die Gärung. II.

Von

Julius Orient.

(Aus der toxikologischen Abteilung des pharmazeutischen Instituts der Universität Cluj (Klausenburg), Rumänien.)

(Eingegangen am 19. November 1923.)

In einer vorangehenden Abhandlung habe ich in dieser Zeitschrift[1]) über den Einfluß einiger Amine auf die Gärung berichtet. Im Verlaufe dieser Untersuchung machte ich die Erfahrung, daß die Amine auf die alkoholische Gärung in gewissen Fällen hemmend wirken, nämlich bei Vermehrung der in ihnen enthaltenen Methylradikale.

Eine analoge Erscheinung ist auch für die tierische Zelle zu beobachten, wie *Külz*[2]) bei einer Untersuchung über die Wirkungsweise der homologen quaternären Ammoniumbasen fand; er hat festgestellt, daß der curareartige Effekt im allgemeinen mit der Länge der Alkylketten wächst. Untersuchungen von *Abderhalden*[3]) bestätigen sodann, daß einige Diaminoderivate der Kohlensäure auf die Gärung zunächst paralysierend wirken, später jedoch aktivieren können.

Neuberg[4]) hatte konstatiert, daß schon bei Anwesenheit kleiner Quantitäten von Aldehydammoniak eine Beschleunigung der Gärung erfolgt. Derselbe Autor[5]) hat mit einer besonders großen Zahl hydroaromatischer Verbindungen Untersuchungen zu dem Zwecke ausgeführt, die Wirkung der in diesen Substanzen vorhandenen verschiedenen Radikale aus der aliphatischen, aromatischen und zyklischen Reihe auf den Ablauf der Gärung festzustellen[6]). Desgleichen wissen wir aus den Untersuchungen von *Neuberg* mit *M. Sandberg*[7]), daß die Purinkörper und ihre Abkömmlinge die Gärung ausgesprochenermaßen zu fördern vermögen.

---

[1]) *Julius Orient*, diese Zeitschr. **132**, 1922.
[2]) *F. Külz*, Pflügers Arch. **195**, 1922.
[3]) *E. Abderhalden*, Fermentforschung **6**, 1922.
[4]) *C. Neuberg*, Sitzungsber. d. Pr. Akad. d. Wiss. **1917**, 595.
[5]) *C. Neuberg* und *M. Ehrlich*, diese Zeitschr. 88, 1918; **101**, 1919.
[6]) *Dieselben*, ebendaselbst **101**, 276.
[7]) *C. Neuberg* und *M. Sandberg*, ebendaselbst **125**, 202.

In den Rahmen meiner Untersuchung nahm ich auch das *Isoamylamin* $(CH_3)_2 : CH-CH_2-CH_2 . NH_2$ auf, welches hauptsächlich durch Mikroorganismen aus Leucin abgespalten wird, wie es in einer für die Hefe- und Gärungsforschung grundlegenden Abhandlung (Theorie der Amylalkoholbildung) schon vor langen Jahren *Müller* und *Hesse*[1]) gezeigt haben; sie isolierten das Isoamylamin aus gefaulter Hefe. Dieselbe Base fanden dann *Gautier* und *Mourgues*[2]) im Lebertran, *Barger* und *Walpole*[3]) im gefaulten Pferdefleisch, sowie *Rosenheim*[4]) in infizierten Placenten. Des weiteren untersuchte ich die im folgenden angeführten Amine, die auch zu den typischen Fäulnisbasen gehören.

Mehrere basische Stoffe waren hinsichtlich ihres Einflusses auf den Gärungsverlauf früher bereits von *Neuberg* und *Sandberg* geprüft worden.

Die Untersuchungen sind in der Art angestellt, wie ich es in meiner ersten Abhandlung in dieser Zeitschrift beschrieben habe.

Alkylamine und ihre Salze.

1. Tetra-methyl-ammonium-jodid $(CH_3)_4N . J$.
2. Äthyl-amin-chlorhydrat $C_2H_5 . NH_2 . HCl$.
3. Diäthylamin-chlorhydrat $(C_2H_5)_2 . NH_2 . HCl$.
4. Diäthylamin, freie Base, $(C_2H_5)_2 . N . H$.
5. Triäthylamin-chlorhydrat $(C_2H_5)_3 . N . HCl$.
6. Triäthylamin, freie Base, $(C_2H_5)_3 . N$.
7. Propylamin $C_3H_7 . NH_2$.
8. Isoamylamin $(CH_3)_2 : CH . CH_2 . CH_2 . NH_2$.

Aminoaldehyde.

9. Glucosamin-chlorhydrat $C_6H_{13}O_5 . N . HCl$.
10. Glucosamin $CH_2OH-(CH . OH)_3 . CH . NH_2 . COH$.

Diamine.

11. Äthylendiamin-chlorhydrat $NH_2 . CH_2 . CH_2 . NH_2 . HCl$.
12. Äthylendiamin-dibenzoat $NH_2 . CH_2 . CH_2NH_2(C_6H_5COOH)_2$.
13. Äthylendiamin $NH_2 . CH_2 . CH_2-NH_2$.
14. Pentamethylendiamin $NH_2-(CH_2)_5-NH_2$.

Indol und Derivate.

15. Indol $C_6H_4<{CH \atop NH}>CH$.
16. Skatol $C_6H_4<{C(CH_3) \atop NH}>CH$.

---

[1]) *Müller* und *Hesse*, Journ. f. prakt. Chem. **70**, 1857.

[2]) *Gautier* und *Morgues*, C. r. **107**, 1888.

[3]) *Barger* und *Walpole*, Journ. of Physiol. **38**, 1909.

[4]) *Rosenheim*, ebendaselbst **38**, 1909.

Tabelle I.

1 proz. Tetramethylammoniumjodid.

Nr	20 proz. Hefeaufschw.	4 proz. Zucker	Nährsalz	1 proz. Tetramethylammoniumjodid	CO_2 in ccm nach 1	2	24	Grad der Einwirkung
	Lösung in ccm				Stunden			
1	3	2	5	—	2,7	6,6	11,0	—
2	3	2	4	1	3,0	7,1	11,7	+ 6,3
3	3	2	3	2	2,7	6,8	12,5	+13,6
4	3	2	2	3	2,9	7,1	11,6	+ 6,0
5	3	2	1	4	2,3	5,2	11,5	+ 4,5
6	3	2	—	5	1,9	5,1	10,6	— 4,6

Tabelle II.

1 proz. Äthylamin-chlorhydrat.

Nr.	20 proz. Hefeaufschw.	4 proz. Zucker	Nährsalz	1 proz. Äthylaminchlorhydrat	CO_2 in ccm nach 1	2	24	Grad der Einwirkung
	Lösung in ccm				Stunden			
1	3	2	5	—	3,2	5,2	12,6	—
2	3	2	4	1	3,8	6,7	12,1	— 3,8
3	3	2	3	2	4,4	7,3	11,2	—11,1
4	3	2	2	3	3,8	7,9	13,2	+ 4,7
5	3	2	1	4	4,2	8,2	12,5	— 0,7
6	3	2	—	5	3,2	6,2	11,8	— 6,0

Tabelle III.

1 proz. Diäthylamin-chlorhydrat.

Nr.	20 proz. Hefeaufschw.	4 proz. Zucker	Nährzalz	1 proz. Diäthylaminchlorhydrat	CO_2 in ccm nach 1	2	24	Grad der Einwirkung
	Lösung in ccm				Stunden			
1	3	2	5	—	4,4	8,0	8,4	—
2	3	2	4	1	5,2	8,2	8,8	+ 4,7
3	3	2	3	2	6,6	9,2	9,4	+11,8
4	3	2	2	3	5,0	8,5	8,9	+ 5,9
5	3	2	1	4	4,8	8,4	8,8	+ 4,7
6	3	2	—	5	4,4	9,3	9,8	+16,6

Tabelle IV.

1 proz. Diäthylamin.

Nr.	20 proz. Hefeaufschw.	4 proz. Zucker	Nährzalz	1 proz. Diäthylamin	CO_2 in ccm nach 1	2	24	Grad der Einwirkung
	Lösung in ccm				Stunden			
1	3	2	5	—	2,4	3,8	11,5	—
2	3	2	4	1	2,4	3,7	10,4	— 8,7
3	3	2	3	2	1,5	2,5	9,2	—20,0
4	3	2	2	3	1,8	1,9	5,5	—53,1
5	3	2	1	4	1,7	1,7	2,9	—74,8
6	3	2	—	5	1,6	3,8	2,7	—76,5

Tabelle V.

1 proz. Triäthylamin-chlorhydrat.

Nr.	20 proz. Hefeaufschw.	4 proz. Zucker	Nährsalz	1 proz. Triäthylamin-chlorhydrat	CO_2 in ccm nach 1	2	24	Grad der Einwirkung
	Lösung in ccm				Stunden			
1	3	2	5	—	0,4	1,6	9	—
2	3	2	4	1	3,6	4,6	12,6	+40,0
3	3	2	3	2	3,7	5,3	13,6	+51,0
4	3	2	2	3	3,7	5,8	12,6	+40,0
5	3	2	1	4	3,8	4,8	13,1	+45,0
6	3	2	—	5	3,4	4,6	12,9	+43,0

Tabelle VI.

1 proz. Triäthylamin.

Nr.	20 proz. Hefeaufschw.	4 proz. Zucker	Nährsalz	1 proz. Triäthylamin	CO_2 in ccm nach 1	2	24	Grad der Einwirkung
	Lösung in ccm				Stunden			
1	3	2	5	—	3,6	7,5	8,6	—
2	3	2	4	1	5,8	10,8	11,0	+ 27,9
3	3	2	3	2	3,8	7,0	8,8	+ 2,3
4	3	2	2	3	1,8	3,4	6,3	— 26,7
5	3	2	1	4	1,6	2,3	2,3	— 73,0
6	3	2	—	5	1,4	1,9	2,0	— 76,0

Tabelle VII.

1 proz. Propylamin.

Nr.	20 proz. Hefeaufschw.	4 proz. Zucker	Nährsalz	1 proz. Propylamin	CO_2 in ccm nach 1	2	24	Grad der Einwirkung
	Lösung in ccm				Stunden			
1	3	2	5	—	4,3	6,2	10,5	—
2	3	2	4	1	3,5	4,9	8,5	— 19,0
3	3	2	3	2	2,5	2,7	4,6	— 37,1
4	3	2	2	3	2,4	2,5	3,5	— 66,6
5	3	2	1	4	3,4	3,6	3,6	— 65,7
6	3	2	—	5	2,7	3,1	2,9	— 71,4

Tabelle VIII.

1 proz. Isoamylamin.

Nr.	20 proz. Hefeaufschw.	4 proz. Zucker	Nährsalz	1 proz. Isoamylamin	CO_2 in ccm nach 1	2	24	Grad der Einwirkung
	Lösung in ccm				Stunden			
1	3	2	5	—	2,6	8,2	11,3	—
2	3	2	4	1	4,1	11,9	14,6	+ 22,6
3	3	2	3	2	6,2	7,3	16,4	+ 31,0
4	3	2	2	3	3,5	3,6	3,9	— 65,4
5	3	2	1	4	2,7	3,5	3,6	— 68,1
6	3	2	—	5	2,5	3,4	3,5	— 69,1

Tabelle IX.

1 proz. Glucosamin-chlorhydrat.

Nr.	20 proz. Hefe-aufschw.	4 proz. Zucker	Nährsalz	1 proz. Glucosamin-chlorhydrat	CO_2 in ccm nach 1	2	24	Grad der Einwirkung
	Lösung in ccm				Stunden			
1	3	2	5	—	3,6	6,5	12,5	—
2	3	2	4	1	3,7	8,9	14,6	+16,8
3	3	2	3	2	3,9	9,3	15,3	+22,4
4	3	2	2	3	4,2	9,5	15,5	+24,0
5	3	2	1	4	4,7	9,4	14,4	+15,2
6	3	2	—	5	4,0	9,6	15,6	+24,8

Tabelle X.

1 proz. Glucosamin.

Nr.	20 proz. Hefe-aufschw.	4 proz. Zucker	Nährsalz	1 proz. Glucosamin	CO_2 in ccm nach 1	2	24	Grad der Einwirkung
	Lösung in ccm				Stunden			
1	3	2	5	—	1,7	3,0	8,5	—
2	3	2	4	1	2,7	3,1	10,2	+ 20,0
3	3	2	3	2	2,6	2,9	11,2	+ 31,6
4	3	2	2	3	1,3	1,4	3,6	— 57,6
5	3	2	1	4	1,2	1,2	1,6	— 81,0
6	3	2	—	5	1,0	1,1	1,6	— 81,0

Tabelle XI.

1 proz. Äthylendiamin-chlorhydrat.

Nr.	20 proz. Hefe-aufschw.	4 proz. Zucker	Nährsalz	1 proz. Äthylen-diamin-chlorhydrat	CO_2 in ccm nach 1	2	24	Grad der Einwirkung
	Lösung in ccm				Stunden			
1	3	2	5	—	3,8	6,7	11,2	—
2	3	2	4	1	4,4	8,0	12,6	+12,5
3	3	2	3	2	4,9	8,0	12,2	+ 8,8
4	3	2	2	3	4,8	7,8	11,4	+ 1,8
5	3	2	1	4	4,4	7,5	11,4	+ 1,8
6	3	2	—	5	4,2	7,3	11,2	±

Tabelle XII.

1 proz. Äthylendiamin-dibenzoat.

Nr.	20 proz. Hefe-aufschw.	4 proz. Zucker	Nährsalz	1 proz. Äthylen-diamin-dibenzoat	CO_2 in ccm nach 1	2	24	Grad der Einwirkung
	Lösung in ccm				Stunden			
1	3	2	5	—	2,5	6,0	11,4	—
2	3	2	4	1	3,0	8,4	13,6	+19,3
3	3	2	3	2	3,4	8,4	13,5	+18,3
4	3	2	2	3	3,8	8,4	12,8	+12,3
5	3	2	1	4	3,3	8,3	13,5	+18,3
6	3	2	—	5	3,0	8,4	11,4	±

Tabelle XIII.

1 proz. Äthylendiamin.

Nr.	20 proz. Hefeaufschw.	4 proz. Zucker	Nährsalz	1 proz. Äthylendiamin	CO_2 in ccm nach 1	2	24	Grad der Einwirkung
	Lösung in ccm				Stunden			
1	3	2	5	—	3,1	7,7	13,0	—
2	3	2	4	1	1,2	3,7	7,6	—44,8
3	3	2	3	2	0,6	1,7	4,2	—69,5
4	3	2	2	3	0,6	1,5	2,3	—83,3
5	3	2	1	4	0,8	1,6	2,3	—83,3
6	3	2	—	5	0,6	1,8	2,3	—83,3

Tabelle XIV.

1 proz. Pentamethylendiamin.

Nr.	20 proz. Hefeaufschw.	4 proz. Zucker	Nährsalz	1 proz. Pentamethylendiamin	CO_2 in ccm nach 1	2	24	Grad der Einwirkung
	Lösung in ccm				Stunden			
1	3	2	5	—	2,7	7,3	11,9	—
2	3	2	4	1	1,9	3,5	8,5	—28,5
3	3	2	3	2	1,1	1,8	5,5	—53,7
4	3	2	2	3	1,1	1,6	2,7	—77,3
5	3	2	1	4	1,3	1,4	2,5	—78,9
6	3	2	—	5	2,0	2,1	2,5	—78,9

Tabelle XV.

1 proz. Indol.

Nr.	20 proz. Hefeaufschw.	4 proz. Zucker	Nährsalz	1 proz. Indol	CO_2 in ccm nach 1	2	24	Mittelwert	Grad der Einwirkung
	Lösung in ccm				Stunden				
1	3	2	5	—	2,5 2,5	5,2 5,1	13,1 13,0	13,1	—
2	3	2	4	1	2,6 2,5	5,7 5,6	13,0 13,0	13,0	—0,7
3	3	2	3	2	2,8 2,7	5,4 5,3	12,7 12,6	12,7	—3,1
4	3	2	2	3	2,6 2,5	5,2 5,3	12,6 12,5	12,6	—3,9
5	3	2	1	4	2,4 2,4	5,0 5,1	12,0 11,9	12,5	—4,7
6	3	2	—	5	2,4 2,3	4,8 4,6	12,2 12,1	12,2	—7,3

Tabelle XVI.
1 proz. Methylindol (Skatol).

Nr.	20 proz. Hefe-aufschw.	4 proz. Zucker	Nährsalz	1 proz. Skatol	CO_2 in ccm nach 1	2	24	Mittel-wert	Grad der Ein-wirkung
	Lösung in ccm				Stunden				
1	3	2	5	—	2,6 2,5	5,6 5,4	10,7 10,6	10,7	—
2	3	2	4	1	2,7 2,6	5,4 5,5	12,6 12,7	12,6	+17,7
3	3	2	3	2	2,4 2,4	5,6 5,6	12,7 12,7	12,7	+18,6
4	3	2	2	3	2,5 2,4	5,6 5,7	12,7 12,6	12,7	+18,6
5	3	2	1	4	2,7 2,6	5,5 5,7	12,7 12,5	12,6	+18,6
6	3	2	—	5	2,7 2,7	5,6 5,5	12,7 12,6	12,7	+18,6

Zusammenfassung.

Bereits in meiner vorigen Abhandlung habe ich darauf hingewiesen, daß gemäß dem Ausfall der Versuche die Alkylamine entsprechend der Zahl der in ihnen vorkommenden Radikale die Gärung fördern.

Beim Tetra-methyl-ammonium-jodid hingegen kommt gerade die entgegengesetzte Wirkung zur Geltung; anfangs wird die Gärung stimuliert, später verzögert.

Interessante Einzelheiten treten auch für die Wirkung der Aminbasen und ihrer Salze in ihrer verschiedenen Wirkung auf die Gärung zutage. Es ergab sich nämlich, daß z. B. das salzsaure Salz des Diäthylamins die Gärung deutlich entfacht, während das freie Diäthylamin die Zymase stark hemmt. Ebenso paralysierend wirken auch die freien Aminbasen Triäthylamin, Propylamin, Isoamylamin, Äthylendiamin, Pentamethylendiamin, ja sogar auch das Glucosamin. Das Chlorhydrat des Glucosamins aktivierte dagegen die Gärung ausgesprochenermaßen; das salzsaure Salz des Pentamethylendiamins wirkte in schwacher Konzentration ebenfalls aktivierend.

Daraus ergibt sich, daß die Salze der biogenen Amine die Hefegärung beeinflussen.

Bekanntlich besteht eine pharmakologische Wirkung der stickstoffhaltigen Substanzen darin, daß sie das Zentralnervensystem reizen und in größeren Dosen lähmen können[1]). Die Äthyl-, Methyl- und Propylaminsalze haben auf den lebenden Organismus keine besondere Wirkung, bzw. ihre Reizwirkung beginnt erst bei Anwendung größerer Dosen. Charakteristisch für die Ammoniumbasen ist, daß sie die Lähmung der motorischen Nervenendigungen herbeiführen[2]). Beim Chlorhydrat des Triäthylamins beobachtet

[1]) *Oswald*, Schweizer med. Wochenschr. **52**, Nr. 40.

[2]) *E. G. Santesson* und *G. Koan*, Skand. Arch. f. Physiol. 1900.

man eine solche Wirkung nicht, dagegen ist bei Tetramethylammoniumsalzen der curareartige Effekt festzustellen. Das Isoamylamin löst kräftige tonische und klonische Krämpfe aus. Bei der Darmfäulnis entstehen aus Aminosäuren unter Kohlensäureabspaltung Aminbasen, ferner auch Indol und Skatol. Sie wirken, wenn sie von der Darmschleimhaut resorbiert werden, als Gifte, so daß man diese Erscheinung früher als Autointoxikation bezeichnet hat[1]).

Nach den Erfahrungen der medizinischen Praxis lösen die von den Bakterien hervorgebrachten Amine zunächst eine Reizwirkung aus, bis vom Organismus zur Verfügung gestellte Säuren sie zu neutralisieren vermögen. Sobald aber die Menge freier Amine derart wächst, daß der Organismus zu ihrer Bindung nicht genügend Säure liefert, treten die paralysierenden Erscheinungen zutage. Im großen und ganzen entsprechen diese Erfahrungen den Wirkungen, welche die biogenen Amine auf die Hefezellen ausüben.

---

[1]) *A. Eustis*, New Orleans, Med. and Surg. Journ. **74**, 1922.

Über die Wirkung der Oxymethylanthrachinon enthaltenden Drogen auf die Gärung.

Von

Julius Orient.

(Aus der toxikologischen Abteilung des pharmazeutischen Instituts der Universität Cluj (Klausenburg), Rumänien.)

(Eingegangen am 19. November 1923.)

Im Laufe der Studien über die Substanzen, welche auf die alkoholische Gärung einzuwirken vermögen, ist man bereits zu zahlreichen und wertvollen Erfahrungen gelangt.

Von den vielen in dieser Richtung ausgeführten Untersuchungen, die man *C. Neuberg* und seinen Schülern verdankt, besitzen vom ärztlichen und pharmazeutischen Standpunkt aus die Ergebnisse derjenigen Untersuchungen eine hohe Wichtigkeit, welche mit Bitterstoffen, wie Aloin und Absynthin angestellt worden sind.

Als Wirkung der genannten Substanzen haben *C. Neuberg* und *M. Sandberg* festgestellt, daß sie zumeist die Gärung fördernd beeinflussen.

Den Gegenstand meiner Untersuchungen über diese Frage bilden die als Arzneimittel besonders häufig verwendeten Drogen, wie Rheum, Aloe, Senna, Cascara sagrado, Frangula, Cassia fistula, Jalappa und Colocynthis, sowie auch deren pharmazeutische Zubereitungen, die in Fällen von pathologischer Darmfäulnis vielfach angewendet werden.

Die betreffenden Experimente führte ich mit der gleichen Versuchsanordnung aus, die ich bei der Prüfung der Aminwirkung auf die Gärung gebraucht hatte.

Untersucht wurden:

1. Rheum chinense.
2. Rheum chinense Schensi.
3. Rheum chinense electa.
4. Rheum bohemicum.
5. Rheum raponticum.
6. Cort. Cascara sagr.
7. Cassia fistula.
8. Cort. frangula.
9. Senna folia.
10. Aloe.
11. Extr. Aloe } beide aus demselben Aloe gezogen.
12. Resina Aloe }
13. Jalappa tubera.
14. Colocynthis.

Tabelle I. Rhiz. rhei chinense.

Nr.	20 proz. Hefeaufschw.	4 proz. Zucker	Nährsalz	Drogen in cg	CO_2 in ccm nach 1	2	24	Mittelwert	Grad der Einwirkung
	Lösungen in ccm				Stunden				
1	3	2	5	—	4,7 4,5	8,5 8,2	9,4 9,1	9,3	—
2	3	2	5	0,01	6,1	11,8	12,9	13,0	+ 39,0
3	3	2	5	0,01	6,2	12,0	13,0		
4	3	2	5	0,05	7,6	13,0	14,0	14,0	+ 50,5
5	3	2	5	0,05	7,7	13,4	13,9		
6	3	2	5	0,1	9,8	15,4	16,6	16,0	+ 72,0
7	3	2	5	0,1	9,8	15,2	16,6		

Tabelle II. Rhiz. rhei schensi mundata.

Nr.	20 proz. Hefeaufschw.	4 proz. Zucker	Nährsalz	Drogen in cg	1	2	24	Mittelwert	Grad der Einwirkung
1	3	2	5	—	3,6 3,5	6,7 6,9	9,0 9,2	9,1	—
2	3	2	5	0,01	5,0	11,3	13,2	13,1	+ 45,9
3	3	2	5	0,01	4,7	11,0	13,0		
4	3	2	5	0,05	6,1	12,7	14,2	14,1	+ 54,9
5	3	2	5	0,05	6,0	12,6	14,0		
6	3	2	5	0,1	8,0	13,0	15,4	15,5	+ 70,3
7	3	2	5	0,1	7,9	13,3	15,6		

Tabelle III. Rad. rhei electa.

Nr.	20 proz. Hefeaufschw.	4 proz. Zucker	Nährsalz	Drogen in cg	1	2	24	Mittelwert	Grad der Einwirkung
1	3	2	5	—	3,0 3,0	7,2 6,9	8,3 8,1	8,2	—
2	3	2	5	0,01	6,5	10,8	12,6	13,7	+ 67,0
3	3	2	5	0,01	6,7	11,2	12,8		
4	3	2	5	0,05	8,5	12,6	13,5	13,5	+ 64,3
5	3	2	5	0,05	8,2	12,3	13,4		
6	3	2	5	0,1	10,6	13,2	13,8	13,9	+ 69,5
7	3	2	5	0,1	11,0	13,6	14,0		

Tabelle IV. Rad. rhei bohemicum.

Nr.	20 proz. Hefeaufschw.	4 proz. Zucker	Nährsalz	Drogen in cg	1	2	24	Mittelwert	Grad der Einwirkung
1	3	2	5	—	4,7 4,5	8,5 8,2	12,6 12,4	12,5	—
2	3	2	5	0,01	6,1	11,8	12,9	13,0	+ 0,4
3	3	2	5	0,01	6,2	12,0	13,0		
4	3	2	5	0,05	7,6	13,4	14,0	14,0	+ 12,0
5	3	2	5	0,05	7,7	13,4	13,9		
6	3	2	5	0,1	9,8	15,4	16,0	16,0	+ 28,0
7	3	2	5	0,1	9,8	15,2	16,0		

Tabelle V. Rheum rhaponticum austriacum.

Nr.	20 proz. Hefeaufschw.	4 proz. Zucker	Nährsalz	Drogen in cg	1	2	24	Mittelwert	Grad der Einwirkung
1	3	2	5	—	3,9 3,9	7,2 7,6	11,4 11,7	11,6	—
2	3	2	5	0,01	6,7	11,4	12,8	12,7	+ 9,4
3	3	2	5	0,01	6,4	11,2	12,5		
4	3	2	5	0,05	8,2	13,5	14,6	14,5	+ 2,5
5	3	2	5	0,05	8,3	13,3	14,3		
6	3	2	5	0,1	8,5	13,8	14,8	14,9	+ 28,3
7	3	2	5	0,1	8,7	14,0	15,0		

Tabelle VI. Cascara sagrada.

Nr.	20 proz. Hefeaufschw.	4 proz. Zucker	Nährsalz	Drogen in cg	CO_2 in ccm nach 1	2	24	Mittelwert	Grad der Einwirkung
	Lösungen in ccm				Stunden				
1	3	2	5	—	3,4	5,5	12,5	12,5	—
					3,3	5,4	12,5		
2	3	2	5	0,01	6,3	9,1	13,5	13,5	+ 8,0
3	3	2	5	0,01	6,5	9,0	13,4		
4	3	2	5	0,05	10,6	11,6	14,7	14,6	+ 17,6
5	3	2	5	0,05	10,6	11,5	14,5		
6	3	2	5	0,1	13,1	13,5	16,6	16,5	+ 37,6
7	3	2	5	0,1	12,9	13,6	16,4		

Tabelle VII. Cassia fistula.

Nr.	20 proz. Hefeaufschw.	4 proz. Zucker	Nährsalz	Drogen in cg	CO_2 in ccm nach 1	2	24	Mittelwert	Grad der Einwirkung
1	3	2	5	—	3,0	6,0	9,2	9,1	—
					3,2	5,8	9,0		
2	3	2	5	0,01	3,5	9,5	11,4	11,2	+ 2,3
3	3	2	5	0,01	3,2	9,0	11,0		
4	3	2	5	0,05	6,2	12,0	12,2	12,5	+ 26,2
5	3	2	5	0,05	6,6	12,5	12,7		
6	3	2	5	0,1	8,2	12,7	13,9	13,7	+ 50,0
7	3	2	5	0,1	8,5	13,0	13,5		

Tabelle VIII. Cortex frangulae.

Nr.	20 proz. Hefeaufschw.	4 proz. Zucker	Nährsalz	Drogen in cg	CO_2 in ccm nach 1	2	24	Mittelwert	Grad der Einwirkung
1	3	2	5	—	3,9	5,7	9,5	9,4	—
					4,0	6,0	9,3		
2	3	2	5	0,01	5,8	10,2	10,8	10,9	+ 15,9
3	3	2	5	0,01	5,9	10,5	11,0		
4	3	2	5	0,05	7,9	13,2	13,9	13,9	+ 47,3
5	3	2	5	0,05	8,2	13,1	13,8		
6	3	2	5	0,1	11,4	15,4	16,2	16,2	+ 72,3
7	3	2	5	0,1	11,7	15,3	16,2		

Tabelle IX. Senna folia alexandr.

Nr.	20 proz. Hefeaufschw.	4 proz. Zucker	Nährsalz	Drogen in cg	CO_2 in ccm nach 1	2	24	Mittelwert	Grad der Einwirkung
1	3	2	5	—	4,9	8,6	11,5	11,6	—
					5,0	8,9	11,7		
2	3	2	5	0,01	6,7	10,2	11,3	11,3	— 2,5
3	3	2	5	0,01	6,5	10,1	11,2		
4	3	2	5	0,05	7,1	11,5	12,0	12,0	+ 3,4
5	3	2	5	0,05	7,1	11,3	11,9		
6	3	2	5	0,1	7,4	11,2	13,6	13,5	+ 16,3
7	3	2	5	0,1	7,5	11,3	13,4		

Tabelle X. Aloes soccotr.

Nr.	20 proz. Hefeaufschw.	4 proz. Zucker	Nährsalz	Drogen in cg	CO_2 in ccm nach 1	2	24	Mittelwert	Grad der Einwirkung
1	3	2	5	—	2,9	5,8	12,7	12,7	—
					2,8	5,5	12,7		
2	3	2	5	0,01	3,0	5,7	12,7	12,8	+ 0,7
3	3	2	5	0,01	2,6	5,9	12,8		
4	3	2	5	0,05	2,4	5,8	13,2	13,3	+ 4,7
5	3	2	5	0,05	2,3	6,1	13,3		
6	3	2	5	0,1	2,6	6,6	13,4	13,3	+ 4,7
7	3	2	5	0,1	2,6	6,6	13,2		

Tabelle XI. Extr. aloes aquosa.

Nr.	20 proz. Hefeaufschw.	4 proz. Zucker	Nährsalz	Drogen in cg	CO_2 in ccm nach 1	2	24	Mittelwert	Grad der Einwirkung
	Lösungen in ccm				Stunden				
1	3	2	5	—	4,3	5,4	12,9	13,0	—
					4,4	5,5	13,0		
2	3	2	5	0,01	3,6	6,1	12,7	12,8	— 1,5
3	3	2	5	0,01	3,8	6,4	12,9		
4	3	2	5	0,05	4,0	7,8	13,3	13,4	+ 3,0
5	3	2	5	0,05	4,5	8,2	13,4		
6	3	2	5	0,1	5,2	9,7	14,9	14,8	+ 13,8
7	3	2	5	0,1	5,6	10,0	14,7		

Tabelle XII. Resina aloes.

Nr.	20 proz. Hefeaufschw.	4 proz. Zucker	Nährsalz	Drogen in cg	CO_2 1	2	24	Mittelwert	Grad der Einwirkung
1	3	2	5	—	4,6	8,9	12,9	12,8	—
					4,4	9,0	12,7		
2	3	2	5	0,01	3,9	9,4	13,0	13,2	+ 3,1
3	3	2	5	0,01	4,0	9,2	13,4		
4	3	2	5	0,05	4,7	9,1	13,0	13,1	+ 2,0
5	3	2	5	0,05	4,9	9,3	13,3		
6	3	2	5	0,1	4,9	9,4	13,8	13,1	+ 2,0
7	3	2	5	0,1	4,6	9,3	13,3		

Tabelle XIII. Jalappa tubera.

Nr.	20 proz. Hefeaufschw.	4 proz. Zucker	Nährsalz	Drogen in cg	CO_2 1	2	24	Mittelwert	Grad der Einwirkung
1	3	2	5	—	2,4	3,4	11,2	11,3	—
					2,5	3,6	11,4		
2	3	2	5	0,01	3,9	7,8	13,4	13,2	+ 16,8
3	3	2	5	0,01	4,2	8,2	13,0		
4	3	2	5	0,05	6,9	10,7	14,0	14,2	+ 25,6
5	3	2	5	0,05	7,4	10,9	14,4		
6	3	2	5	0,1	11,3	14,4	16,4	16,3	+ 44,2
7	3	2	5	0,1	11,2	13,8	16,2		

Tabelle XIV. Colocynthis fructus.

Nr.	20 proz. Hefeaufschw.	4 proz. Zucker	Nährsalz	Drogen in cg	CO_2 1	2	24	Mittelwert	Grad der Einwirkung
1	3	2	5	—	3,8	5,5	13,1	13,1	—
					3,6	5,2	13,0		
2	3	2	5	0,01	5,2	9,8	12,0	12,0	— 7,6
3	3	2	5	0,01	4,6	9,6	11,9		
4	3	2	5	0,05	8,6	10,6	12,5	12,7	— 3,0
5	3	2	5	0,05	8,6	10,8	12,8		
6	3	2	5	0,1	10,8	12,1	14,0	14,2	+ 7,6
7	3	2	5	0,1	10,2	12,4	14,3		

Zusammenfassung.

Die angeführten experimentellen Daten weisen aus, daß die Rheumarten im allgemeinen auf die Gärung fördernd einwirken. Besonders lebhaft stimulierten die Gärung diejenigen echten Rheumarten, welche reich an Trioxymethylanthrachinon sind, wie Rheum Schensi und das sortierte echte chinesische Rheum. Mit gleicher Intensität bestätigt dies auch die Frangularinde. Das wird verständlich, da *Oesterle* gezeigt hat, daß ihr wirksamer Bestandteil Emodin ist, das in jeder Hinsicht dem Emodin rhei entspricht.

Rheum nostras sowie Rheum raponticum, ferner Rheum bohemicum, die in pharmazeutischer Hinsicht minderwertig sind und wenig oder gar kein Emodin enthalten, wirken im Vergleich mit den echten Rheumarten viel weniger fördernd auf die Gärung. Cassia fist., Cascara sagr., die Glucoside aus der Anthrachinonreihe enthalten, begünstigen zwar deutlich die Gärung, doch reicht ihr Einfluß nicht an den der oben erwähnten vorzüglichen Laxantien heran.

Das Aloe, welches das sogenannte Aloe-Emodin (Oxymethylanthrachinon) enthält, wirkt in geringer Menge hemmend auf die Gärung, vermag jedoch dieselbe in größerer Quantität zu aktivieren. Aus den Untersuchungen von *Neuberg* und *Sandberg*[1]) wissen wir, daß Aloin selber die Gärung hemmt; das Harz jedoch, welches nach der Extraktion des Aloins mit Wasser zurückbleibt, fördert die Gärung mäßig, wie es auch bei der Senna der Fall ist. Von anderen, Oxymethylanthrachinon enthaltenden Drogen, die als Laxantien bekannt sind, wirkt Jalappa gleich Cascara sagr. geringer fördernd, Colocynthis, jedenfalls anfänglich, paralysierend auf den Gärungsvorgang.

Die oben beschriebene Wirkung auf die Gärung kann zu einer biologischen Bestimmungsmethode der pharmazeutisch wichtigen Oxymethylanthrachinon enthaltenden Rheumarten dienen. Ihr pharmakodynamischer Wert geht dem Grade ihrer gärungssteigernden Wirkung parallel.

---

[1]) *C. Neuberg* und *M. Sandberg*, diese Zeitschr. **125**, 1921.

Fermente und Licht. IV.

Von

Ludwig Pincussen.

Diastase III.

Von

Francesco di Renzo (Palermo).

(Aus der biochemischen Abteilung des städtischen Krankenhauses am Urban, Berlin.)

(Eingegangen am 19. November 1923.)

Nachdem in einer früheren Arbeit gezeigt worden war, daß die Wirkung des Lichtes auf die Diastase von verschiedenen Verhältnissen, insbesondere der Verdünnung und der Reaktion abhängig ist, sollte hier versucht werden festzustellen, wie der Mechanismus der Lichtschädigung erfolgt. Zu den Versuchen wurde ein im Handel erhältliches Diastasepräparat hoher Konzentration benutzt, das vorher nicht weiter gereinigt wurde, sondern in direkt dargestellten und filtrierten Lösungen verwendet wurde.

Über den Mechanismus der Fermentzerstörung liegt nur ein exakter Versuch vor, die Arbeit von *Signe* und *Sigval Schmidt-Nielsen* (2), welche unter allen möglichen Vorsichtsmaßregeln die Wirkung des Quecksilberbogenlichtes auf Labferment untersucht haben. In ihren sehr sorgfältig ausgeführten Versuchen stellten sie fest, daß die Abschwächung des Labs durch Licht eine monomolekulare Reaktion ist, mit geringer Abhängigkeit von der Temperatur. Diese Wirkung wird fast ausschließlich von den ultravioletten Strahlen ausgelöst.

Für die hier zu schildernden Versuche diente als Lichtquelle eine Quecksilberquarzlampe von rund 2000 Kerzen Helligkeit. Da sich herausstellte, daß die Lampe eine konstante Helligkeit sowie gleichmäßige Klemmenspannung erst nach 15 bis 20 Minuten erreicht, wurde erst nach dieser Zeit mit den Versuchen begonnen. Die Belichtung fand statt in Reagenzgläsern aus Quarz von 7 mm Durchmesser und 100 mm Länge, die zu gleicher Höhe mit den zu belichtenden Lösungen

gefüllt wurden. Sie wurden in einem Gestell nebeneinander aufgestellt, das genau gegenüber und parallel dem Beleuchtungskörper, und zwar in 20 cm Entfernung, stand, so daß die Belichtung ganz gleichmäßig war. In einer Reihe von Versuchen wurden außerdem die Röhrchen in bestimmten Zwischenräumen miteinander vertauscht, um ganz sicher eine gleichmäßige Belichtungsintensität zu garantieren. Im selben Gestell stand die Dunkelprobe in gewöhnlichem Glase, durch einen Metallmantel geschützt. Da die Belichtung in einem großen Raume vorgenommen wurde, konnte eine Störung durch Gase, wie z. B. Ozon, als ausgeschlossen gelten. Sicherlich kommt kein Einfluß von Stickoxydul in Betracht, wie ihn *Kestner* für die Lichtwirkung als wesentlich annimmt. Es wird an anderer Stelle diese Frage nochmals genauer abgehandelt werden. Sämtliche Versuche sind wiederholt angestellt: die Ergebnisse entsprachen einander mit kleinen, aus den Versuchsbedingungen erklärlichen Abweichungen. Da die sämtlichen Proben eines Versuchs zusammen belichtet wurden, konnte auch von Vorsichtsmaßregeln, wie Konstanthaltung der Temperatur und dergleichen abgesehen werden. Im übrigen waren die Differenzen nur geringe.

Die Anstellung der Versuche gestaltete sich dementsprechend folgendermaßen. Eine 0,1- bzw. 0,2proz. Lösung der Diastase wurde durch ¼stündiges Schütteln hergestellt, nach einigem Stehen filtriert und die so erhaltene Lösung in die Reagenzgläser (fünf Quarzgläser und ein gewöhnliches Glas) verteilt. Nachdem alles vorbereitet war, wurde ein Schirm, welcher das Licht zuerst verdeckte, fortgenommen und nun, nach je 3 Minuten, ein Gläschen aus dem Gestell entfernt und im selben Raume beiseite gestellt. Nach fertiger Belichtung wurde mit allen Proben eine Prüfung auf die gebildete Maltose angestellt. Im Anschluß an die Ausführungen von *Willstätter* (3) wurde zur Bestimmung die Titration mit Hypojodit nach *Willstätter* und *Schudel* (4) gewählt, obgleich es nach *Willstätter* nicht ganz unbedenklich erscheint, für Malzdiastase diese Methode zu benutzen. Sie gab jedenfalls sehr eindeutige Resultate. Es wurden große Jenaer Reagenzgläser vorbereitet, welche je 10 ccm einer Lösung von löslicher Stärke enthielten. Dazu kam 1 ccm einer m/3 Phosphatlösung, und zwar wurde diese wechselnd zwischen p_H 5,9 und 7,35 gewählt. Es wurde sehr schnell zu diesen kalten bzw. gekühlten Mischungen je 1 ccm Fermentlösung zugefügt und die Gläser zusammen in einem Gestell in ein Wasserbad von 40^0 eingebracht. Sie blieben dort 10 bzw. 15 Minuten, wurden zusammen herausgenommen, in kaltes Wasser eingestellt und durch schnelle Zugabe von je 2 ccm n HCl die Verdauung unterbrochen. Eine Kontrolle, die statt der Diastaselösung Wasser enthielt, lief bei jedem Versuch daneben.

Der Inhalt der Röhrchen wurde darauf in Erlenmeyerkölbchen überspült, mit Wasser zweimal zu gleichem Volumen nachgewaschen, 5 ccm n/10 Jodlösung und 3,5 ccm n Natronlauge zugegeben (aus einer Bürette) und 15 Minuten stehengelassen. Danach wurde mit je 2 ccm verdünnter Schwefelsäure angesäuert und mit n/10 Thiosulfat titriert.

Zur Berechnung wurde die verbrauchte Jodlösung von der beim Leerversuch erhaltenen abgezogen und daraus die gebildete Maltose durch Multiplikation mit 17,15 mg berechnet.

Zur Feststellung der Reaktionskonstanten wurde in Anlehnung an die Ausführungen von *Willstätter* als Anfangskonzentration 75 Proz. der angewandten Stärke eingesetzt und der Wert der Reaktionskonstanten k nach der Formel $\frac{1}{t} \cdot \log \frac{a}{a - x}$ in üblicher Weise berechnet.

Tabelle I. Fermentlösung 0,2 proz.

p_H	t	Stärke 1,0 Proz.		Stärke 0,5 Proz.		Stärke 0,25 Proz.	
		Maltose mg	$k \cdot 10^4$	Maltose mg	$k \cdot 10^4$	Maltose mg	$k \cdot 10^4$
5,91	0	43,5	377	26,5	532	14,7	444
	3	42,0	357	25,8	530	13,0	342
	6	39,4	324	24,0	444	12,3	309
	9	35,8	282	23,1	416	12,2	304
	12	32,0	242	20,8	351	11,8	287
	15	25,6	181	14,5	212	9,9	217
6,26	0	41,0	344	25,2	484	14,6	437
	3	38,5	313	24,5	460	14,0	398
	6	33,5	257	23,0	413	13,8	386
	9	29,5	217	22,3	392	12,8	339
	12	24,5	172	19,0	307	12,0	300
	15	20,2	137	14,3	208	10,5	238
6,64	0	40,0	331	24,0	444	12,6	336
	3	37,8	305	23,2	420	12,3	309
	6	35,0	273	21,2	362	12,2	304
	9	29,8	220	20,2	336	11,3	267
	12	24,5	172	19,5	319	10,9	250
	15	17,1	113	17,2	267	9,4	201
6,98	0	41,0	344	23,8	438	12,2	304
	3	37,5	301	23,5	429	12,2	304
	6	34,5	268	21,8	378	11,8	287
	9	29,0	212	19,5	319	11,0	259
	12	23,5	163	16,8	258	10,5	238
	15	20,0	135	12,7	180	8,8	183
7,35	0	35,5	278	22,2	389	13,2	352
	3	33,0	252	21,4	368	13,0	342
	6	30,0	222	20,0	330	13,0	342
	9	26,5	189	17,8	280	12,5	318
	12	23,5	163	14,4	211	11,0	259
	15	18,4	122	12,5	176	9,4	201

Tabelle I zeigt zusammenfassend die erhaltenen Maltosewerte sowie die Reaktionskonstanten bei Anwendung einer 0,2proz. Fermentlösung unter Belichtung bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen. Von einer Mitteilung des Zerstörungskoeffizienten im *Euler*schen Sinne, über den später noch zu sprechen sein wird, wurde in der Tabelle abgesehen, da er irgendwelche Schlüsse vorderhand nicht erlaubt. Das sich aus den Werten berechnende dauernde Ansteigen dieses Quotienten spricht für eine komplizierte Reaktion, über die an anderem Orte noch gesprochen werden soll. Abgesehen von anderen, das Thema nicht direkt berührenden Dingen zeigt die Tabelle eine dauernde Abnahme der Maltosebildung bzw. der Reaktionskonstanten in ziemlich geringem Ausmaß, was augenscheinlich damit zusammenhängt, daß konzentriertere Lösungen von Fermenten nur verhältnismäßig wenig durch Licht geschädigt werden (l. c. 1).

Das Bild wird erheblich klarer und einfacher, wenn wir 0,1proz. Fermentlösungen verwenden. Während wir in den vorigen Versuchen relativ hohe Fermentkonzentration im Vergleich zur Stärkekonzentration anwandten, liegt bei diesen Versuchen die Sachlage anders, am einfachsten bei dem Versuch der Tabelle II, wo die Wirkung einer 0,1proz. Fermentlösung auf eine 1proz. Lösung löslicher Stärke geprüft wird. In dieser Tabelle sowie in den weiteren III und IV, welche mit 0,5- bzw. 0,25proz. Stärkelösung angestellt sind, ist zugleich die Inaktivierungskonstante nach *Euler* (5) berechnet, die sich aus der Annahme ergibt, daß die Inaktivierung durch eine monomolekulare Reaktion dargestellt wird.

Bezeichnet E die ursprüngliche Fermentkonzentration, y die zur Zeit t zerstörte Fermentmenge, so ist

$$\frac{dy}{dt} = k_c(E - y) \quad \text{oder} \quad k_c = \frac{1}{t} \ln \frac{E}{E - y}.$$

Hier stellt k_c die Inaktivierungskonstante dar. Da die Geschwindigkeitskonstante naturgemäß als relatives Maß der Enzymkonzentration anzusehen ist, kann die Gleichung auch geschrieben werden:

$$k_c = \frac{1}{t} \ln \frac{k_0}{k_t}.$$

In dieser Formel bedeutet k_0 die Reaktionskonstante der aktiven unbehandelten Enzymlösung, k_t den Wert nach einer Belichtungsdauer von t Minuten, beide multipliziert mit 10^4, um ganze Zahlen zu erhalten.

Wie die Durchsicht der Tabelle II ergibt, ist die Inaktivierungskonstante bei allen Versuchen genügend konstant, um daraus den Schluß zu ziehen, daß es sich bei der Fermentzerstörung bei allen untersuchten $[H^{\cdot}]$ um eine monomolekulare Reaktion handelt. Kleine

Tabelle II. Ferment 0,1 Proz., Stärke 1,0.

p_H		Maltose	$k \cdot 10^4$	$\frac{1}{t} \ln \frac{k_0}{k_t} \cdot 10^3$	p_H	t	Maltose mg	$k \cdot 10^4$	$\frac{1}{t} \ln \frac{k_0}{k_t} \cdot 10^3$
5,91	0	42	238	—	6,64	9	14,2	61	125
	3	30,5	151	140		12	9,5	39	132
	6	21,8	99	146		15	5,8	23	140
	9	15,5	62	148	6,98	0	35	182	—
	12	9,8	41	147		3	25,2	119	141
	15	6,8	27	145		6	18	80	137
6,26	0	41,2	230	—		9	12,5	53	139
	3	27,9	135	179		12	7,8	28	144
	6	17,6	77	182		15	5,0	20	147
	9	12,2	51	165	7,35	0	27,4	132	—
	12	7,0	28	176		3	20,5	92	120
	15	4,8	19	166		6	15,1	65	116
6,64	0	36,2	191	—		9	11,2	47	115
	3	27,3	131	126		12	8,5	35	111
	6	20,5	92	122		15	6,5	26	109

Abweichungen dürften auf Versuchsfehler zurückzuführen sein. Es gilt also für einen Substratüberschuß und geringe Fermentkonzentration das Gesetz der Zerstörung nach der monomolekularen Formel.

Tabelle III. Ferment 0,1 Proz., Stärke 0,5 Proz.

p_H	t	Maltose mg	$k \cdot 10^4$	$\frac{1}{t} \ln \frac{k_0}{k_t} \cdot 10^3$	p_H	t	Maltose mg	$k \cdot 10^4$	$\frac{1}{t} \ln \frac{k_0}{k_t} \cdot 10^3$
5,91	0	24	296	—	6,64	9	4,6	38	202
	3	23,4	283	18		12	2,7	21,5	199
	6	15,2	151	112		15	1,2	10	210
	9	8,0	69	162	6,98	0	21,8	252	—
	12	5,2	43	169		3	20,7	231	29
	15	3,3	27	160		6	16,8	172	64
6,26	0	23,7	290	—		9	8,4	73	137
	3	19,6	214	101		12	6,7	57	124
	6	12,8	121	148		15	4,3	36	129
	9	6,7	57	181	7,35	0	18,5	197	—
	12	3,8	31	186		3	14,0	135	126
	15	1,7	13	206		6	10,5	95	122
6,64	0	20,8	234	—		9	7,3	63	126
	3	17,2	177	91		12	4,6	38	137
	6	10,7	97	168		15	2,9	23	139

Die Verhältnisse sind bei 0,5proz. Stärke (Tabelle III) etwas verändert. Man findet zuerst eine starke Zunahme der Inaktivierung, bis gegen Ende das Gesetz der monomolekularen Reaktion wieder Gültigkeit erwirbt. Das nicht an Stärke gebundene Ferment verhält sich prinzipiell anders als das gebundene. In der Folge treten die in Tabelle II bei Anwendung von Stärkeüberschuß gezeigten Verhältnisse in Kraft.

Tabelle IV.

Ferment 0,1 Proz., Stärke 0,25 Proz.

p_H	t	Maltose mg	$k \cdot 10^4$	$\frac{1}{t} \ln \frac{k_0}{k_t} \cdot 10^3$	p_H	t	Maltose mg	$k \cdot 10^4$	$\frac{1}{t} \ln \frac{k_0}{k_t} \cdot 10^3$
5,91	0	12,5	315	—	6,64	9	4,5	79	161
	3	12,3	309	6		12	3,6	62	141
	6	8,9	186	87		15	2,6	43	137
	9	6,0	112	116	6,98	0	11,3	267	—
	12	3,8	66	131		3	11,3	267	0
	15	2,6	43	133		6	10,1	224	28
6,26	0	13,3	357	—		9	8,4	172	49
	3	11,6	279	92		12	5,3	96	85
	6	7,5	146	149		15	3,6	62	97
	9	3,9	67	186	7,35	0	12,0	296	—
	12	2,8	47	169		3	11,8	287	10
	15	2,6	43	141		6	10,8	248	29,5
6,64	0	12,6	336	—		9	8,7	181	55
	3	10,5	238	115		12	6,6	112	81
	6	8,8	183	101		15	4,6	81	86

Die Ergebnisse der Tabelle IV, in welcher eine 0,25proz. Stärkelösung angewandt wurde, sind noch schwieriger deutbar. Wir sehen prinzipiell auch hier zunächst ein starkes Ansteigen, dem dann ein Gleichbleiben, in einzelnen Fällen sogar eine Abnahme der Inaktivierungskonstanten folgt. Es muß dahingestellt bleiben, ob es sich um Versuchsfehler oder um eine charakteristische Erscheinung handelt. Auffallend ist, daß sich dieser Modus nur bei den Proben mit einer p_H von 6,26 und 6,64 findet.

Als Nebenbefund mag noch gebucht werden, daß sich bei allen Versuchen eine maximale Abnahme der Reaktionskonstanten bei einer p_H von 6,26 fand. Die maximale Wirkung des inaktivierten Ferments lag bei 6,26 bis 5,91, was früheren Angaben des einen von uns über die zunehmende Lichtwirkung auf Malzdiastase bei abnehmender p_H entspricht.

Es wird nötig sein, in weiteren Untersuchungen die Verhältnisse bei Fermentüberschuß genau festzulegen. Der Mechanismus der Diastasezerstörung durch Licht bei Einwirkung auf einen Stärkeüberschuß scheint durch diese Untersuchungen im wesentlichen aufgeklärt.

Literatur.

1) Diese Zeitschr. **134**, 459, 1923. — 2) Zeitschr. f. physiol. Chem. **58**, 232, 1908. — 3) Ebendaselbst **126**, 143, 1923. — 4) Ber. d. deutsch. chem. Ges. **51**, 780, 1918. — 5) Chemie der Enzyme, I., S. 174, 1920.

Fermente und Licht. V.

Diastase IV.

Von

Ludwig Pincussen.

(Aus der biochemischen Abteilung des städtischen Krankenhauses am Urban, Berlin.)

(Eingegangen am 19. November 1923.)

In der ersten Mitteilung dieser Serie (1) ist bereits kurz erwähnt worden, daß den Salzen ein gewisser Einfluß auf die Schädigung der Diastase durch Licht zukommt. Schon dort wurde erwähnt, daß unter Umständen neben allgemeinen Momenten spezifische Einflüsse obwalten können. Es soll im nachstehenden mehreres über die Salzwirkung mitgeteilt werden: hiermit sind die Versuche jedoch noch nicht abgeschlossen, da die hier mitgeteilten Ergebnisse nur auf einen Teil der zu lösenden Fragen eine Antwort geben.

Die Versuche sind auf zweierlei Art angestellt worden: einesteils wurde die Diastasewirkung in gleicher Weise geprüft, wie das in der ersten Mitteilung geschildert worden ist, es wurde nach dem *Wohlgemuth*schen Reihenprinzip gearbeitet, andererseits wurde auch die Maltose bestimmt. Über die Begründung und Berechnung, ebenso über die Ausführung des Verfahrens kann ich auf die in der vorstehenden vierten Mitteilung gemachten Angaben verweisen. Beide Methoden ergaben im wesentlichen gleichsinnige Resultate. Ob im einzelnen Abweichungen vorkommen, soll später mitgeteilt werden. Die bisher vorliegenden Versuche lassen einen bindenden Schluß in dieser Hinsicht nicht zu. wenn es auch scheint, daß das stärkespaltende und das zuckerbildende Ferment sich durch die Lichtwirkung differenzieren lassen.

Als Lichtquelle diente in wenigen Versuchen das Licht der Sommersonne, wobei natürlich darauf geachtet werden mußte, daß keine Erwärmung eintrat, was durch Einstellen der Versuchsgefäße in ein Wasserbad unschwer gelang. Tabelle I zeigt einen Versuch, der nach beiden Methoden mit Sonnenlicht ausgeführt wurde. In ihm wurde

eine 0,1 proz. Lösung der bereits in den früheren Versuchen angewandten Malzdiastase verwandt, welche, einerseits mit dem gleichen Volumen Wasser, andererseits mit demselben Volumen einer 10proz. Kochsalzlösung vermischt, dem Sonnenlicht ausgesetzt wurde. Wie die Tabelle zeigt, wird sowohl das stärkespaltende wie auch das zuckerbildende Ferment durch den Salzzusatz deutlich geschützt.

Tabelle I.

Malzdiastase 0,1 proz. a) Diastaselösung + gleiche Menge Wasser. b) Diastaselösung + gleiche Menge 10proz. NaCl. Sonnenlicht (Juni) bei 20° Wasserbad, 4 Stunden. Verdaut bei $p_H = 4,6$ (Phosphat).

Diastaseversuch.

Röhrchen	1	2	3	4	5	6	7	8
Ohne Salz, hell . .				⋌	✗	✸	✸	✸
„ „ dunkel					⋌	✗	✸	✸
Mit Salz, hell . . .					✗	✸	✸	✸
„ „ dunkel .					×	✸	✸	✸

Maltaseversuch.

	Gebildete Maltose		
	hell mg	dunkel mg	Differenz mg
Ohne Salz	36,8	43,4	4,8
Mit Salz	39,3	41,7	2,4

Bedeutung der Zeichen: ✸ ganz unverdaut (rein blau),
✗ fast unverdaut (blau mit rötlichem Stich),
× teilweise verdaut (rot),
⋌ zum größten Teil verdaut (schwach rot),
/ fast verdaut (rötlich).

Ganz ähnliche Wirkung ergibt sich bei Belichtung von Diastaselösungen mit wechselndem Phosphatgehalt. In dem Versuch der Tabelle II wie auch den weiter mitgeteilten fand die Belichtung durch eine Quarzlampe von 2000 Kerzen in Entfernung von 60 cm in einem großen Raume statt, so daß gebildetes Ozon keine Wirkung ausüben konnte. Es wird späterhin gezeigt werden, daß hier eine Fehlerquelle vorhanden ist, die unter Umständen zu Trugschlüssen Anlaß geben kann. Es wurde bei einer p_H von 6,64 gearbeitet, also in mäßiger Entfernung vom optimalen Reaktionspunkt, und die Lösungen so gehalten, daß sie einerseits m/6, andererseits m/30 Phosphat enthielten. Die Tabelle ergibt eine erheblich geringere Schädigung in der konzentrierteren Phosphatlösung.

Tabelle II.

Malzdiastase 0,1 proz. — 60 Minuten Quarzlampe. a) 20 ccm + 20 ccm m/3 Phosphat p_H 6,64. b) 20 ccm + 4 ccm m/3 Phosphatlösung + 16 ccm Wasser.

Diastaseversuch.

	Röhrchen	1	2	3	4	5	6	7	8
Hell	a m/6 Phosphat					<	×	×	×
	b m/30 ,,				/	×	×	×	×
Dunkel	a m/6 ,,					/	×	×	×
	b m/30 ,,					/	×	×	×

Maltaseversuch.

Phosphatkonzentration	Gebildete Maltose hell mg	dunkel mg	Differenz mg
m/6	16,6	18,3	1,7
m/30	10,2	18,6	8,4

Versuch 3 ergibt für das zuckerbildende Ferment bei Anwendung von Pankreatin Rhenania ein prinzipiell gleiches Resultat bei veränderten Versuchsbedingungen. Es wurde hier die Phosphatkonzentration konstant gehalten und bei der einen Probe außerdem Kochsalz zugefügt.

Tabelle III.

Pankreatin 0,1 proz. a) 25 ccm + 12,5 ccm m/3 Phosphat + 12,5 ccm Wasser. b) 25 ccm + 12,5 ccm m/3 Phosphat + 12,5 ccm 20 proz. NaCl-Lösung. Quarzlampe 1 Stunde.

p_H	Fermentmenge ccm	a (ohne Salz) Maltose hell	dunkel	Differenz	b (mit Salz) Maltose hell	dunkel	Differenz
6,7	0,2	41,5	47,5	6,0	49,0	49,0	—
7,0	0,1	21,1	31,5	10,4	33	35,0	2,0

Nach Versuch 4 spielt zunächst die Art des Salzes keine Rolle; es wurde hier einerseits in Phosphatmischung, andererseits in Acetatmischung belichtet; die molare Konzentration der Lösungen war gleich, ebenso die Wasserstoffionenkonzentration. Die Bestimmung des zuckerbildenden Ferments ergab in beiden Fällen einen erheblichen Schutz durch das Salz.

Tabelle IV.

Malzdiastase 0,1 proz. Belichtung 3 × 15 = 45 Minuten.

a) In Phosphatmischung p_H 6,64.

	m/3 Phosphat : Maltose mg	m/15 Phosphat : Maltose mg
Hell	28,5	22,1
Dunkel	43,0	40,5
Differenz	14,5	18,4

b) In Acetatmischung p_H 6,60.

	n Acetat : Maltose mg	n/5 Acetat : Maltose mg
Hell	34,6	31,6
Dunkel	43,5	45
Differenz	8,9	14,4

Es fragt sich nun, wie diese Tatsache zu deuten ist. Es scheint kein Zweifel zu sein, daß der Grund der geringeren Lichtschädigung die Vergröberung der Teilchen durch den Salzzusatz ist, die zwar einerseits die fermentative Wirkung gegenüber der ohne Salz in gewissem Maße herabsetzt, auf der anderen Seite aber die Empfindlichkeit gegen Licht abschwächt. Es ist bekannt, daß durch Belichtung eine Teilchenvergröberung ausgelöst werden kann, daß sich aus feindispersen grobdisperse Komplexe bilden. Es ist sehr wahrscheinlich, daß die schwächere Fermentwirkung nach Belichtung darauf zurückzuführen ist, daß ein solcher Prozeß sich bei den Fermentteilchen abspielt und so die Fermentwirkung verringert. Sind die Teilchen schon durch den Salzzusatz vergröbert, so findet dieser Prozeß in weit geringerem Maße statt.

Amandus Hahn (2) hat in seinen Arbeiten über Diastase festgestellt, daß durch Salzzusatz der isoelektrische Punkt des Ferments nach der sauren Seite hin verschoben wird. Obgleich er bezüglich der Verschiebung der optimalen Reaktion negative Ergebnisse erhalten hat — er meint, daß trotz der Veränderung der elektrischen Natur die Wirkungsweise des Ferments, vor allem das Optimum, unverändert bleibt —, interessierte es doch nachzusehen, ob sich die „Schutzwirkung des Salzes“ bei verschiedenen Reaktionen änderte. Die Versuche der Tabelle V sind ebenfalls an Malzdiastase angestellt. Es wurden vermischt 20 ccm 0,1 proz. Fermentlösung mit 12 ccm m/3 Phosphatlösung und 2 ccm Wasser und 4 ccm 5 n NaCl. Die Kontrolle enthielt statt der Kochsalzlösung die gleiche Menge Wasser. Die Lösungen waren also auf Phosphat m/9 und die Salzproben auf NaCl n/2. Die zugesetzte Kochsalzmenge war also gegenüber dem Phosphat verhältnis-

mäßig gering. Die in der Tabelle V dargestellten Ergebnisse zeigen, daß ein durchgreifender Unterschied zwischen den verschiedenen p_H nicht besteht: daß die Schutzwirkung bei p_H 6,64 etwas geringer ist und von dort nach beiden Seiten hin sich gleichsinnig ändert, möchte ich vorläufig nicht weiter verfolgen, bei dieser Gelegenheit aber gleich hinzufügen, daß bei Anwendung geringerer Phosphatkonzentrationen und hoher NaCl-Mengen gewisse Verschiebungen beobachtet werden, über die später berichtet werden soll.

Tabelle V.

Malzdiastase 0,1 Proz. Belichtung mit Quarzlampe. Phosphatgehalt m/9.

p_H	Mit NaCl-Zusatz : Maltose			Ohne NaCl : Maltose			Mehrbildung von Maltose nach Belichtung auf Salzzusatz Proz.
	hell	dunkel	Differenz	hell	dunkel	Differenz	
5,2	8,5	32,2	23,7	5,0	32,0	27,0	14
6,26	8,6	25,0	16,4	6.2	26,0	19,8	21
6,64	8,7	17,5	8,8	9,6	20,6	11,0	25
6,98	7,6	12,7	12,7	5,9	21,0	15,1	19
7,35*)	3,1	20,2	17,1	3,9	23,6	19,7	15

*) Länger verdaut, 15 Minuten.

Versuche mit Jodsalzen hatten gezeigt, daß außer dieser allgemeinen Salzwirkung, die unter den angewandten Versuchsbedingungen sich stets als Schutz gegen die Lichtwirkung dokumentiert, auch eine spezifische Wirkung Platz greifen kann. Ich habe daher systematisch eine Reihe von Salzen einwertiger Ionen in dem Sinne geprüft, ob in ihrer Schutzwirkung gegen Licht Unterschiede bestehen. Ich wählte hierfür wieder die Diastasemethode in der früher beschriebenen Ausführung, als Ferment eine 0,1 proz. Lösung von Takadiastase, welche außerordentlich genaue Resultate ergab. Es wurden 20 ccm Fermentlösung mit 3 ccm m/3 Phosphatgemisch p_H 6,64 und 17 ccm Wasser versetzt (A). Die Proben mit Salz wurden so hergestellt, daß 1 ccm Wasser durch 1 ccm Salzlösung (B), 2 ccm Wasser durch 2 ccm Salzlösung (C), endlich 4 ccm Wasser durch 4 ccm Salzlösung ersetzt wurden (D). Sämtliche Salzlösungen wurden in der Normalität angewandt, also NaCl-Lösung 5,8 proz., NaBr-Lösung 10,3 proz. usw. Belichtet wurde in Quarzkolben, 60 cm von der Lampe während 90 Minuten. Die Verdünnungen wurden in üblicher Weise 1 : 2, 1 : 4 usw. genommen. In jedes Glas kamen 2 ccm einer 0,1 proz. Stärkelösung. Die Tabellen VI bis VIII zeigen die Ergebnisse, und zwar sind im wesentlichen die Resultate und die Tabellen nach den Anionen geordnet, wenn auch nicht feststeht, daß diese bei der Takadiastase eine ähnliche Rolle spielen wie bei den tierischen Amylasen. Übereinstimmend zeigen alle Tabellen eine Schutzwirkung der zugesetzten Salze.

Tabelle VI.

Chloride.

	Röhrchen	Hell 1	2	3	4	5	6	7	8	Dunkel 1	2	3	4	5	6	7	8
Na	A		/	/	⋌	✱	✱	✱	✱				/	⋌	✱	✱	✱
	B				/	X	✱	✱	✱				/	⋌	✱	✱	✱
	C			/	⋌	X	✱	✱	✱				/	⋌	✱	✱	✱
	D			/	X	✱	✱	✱	✱				/	⋌	✱	✱	✱
K	A				⋌	✱	✱	✱	✱					⋌	✱	✱	✱
	B					X	✱	✱	✱					⋌	✱	✱	✱
	C				/	X	✱	✱	✱					⋌	✱	✱	✱
	D				/	✱	✱	✱	✱					⋌	✱	✱	✱
Li	A		/	X	✱	✱	✱	✱	✱				/	X	✱	✱	✱
	B			/	⋌	X	✱	✱	✱				/	X	✱	✱	✱
	C			/	X	✱	✱	✱	✱				/	X	✱	✱	✱
	D			X	✱	✱	✱	✱	✱				/	X	✱	✱	✱
NH_4	A			/	X	✱	✱	✱	✱				/	⋌	✱	✱	✱
	B				⋌	X	✱	✱	✱				/	⋌	✱	✱	✱
	C			/	⋌	✱	✱	✱	✱				/	⋌	✱	✱	✱
	D			/	X	✱	✱	✱	✱				/	⋌	✱	✱	✱

Tabelle VI, welche die Chloride umfaßt, gibt für alle angewandten Salze deutlich eine erhebliche Schutzwirkung bei Anwendung kleiner Salzmengen, während größere diesen Schutz zum Teil wieder aufheben. Daß die Wirkung des Lichtes bei der Anwendung der verschiedenen Salze nicht ganz gleich groß ist, soll hier nicht weiter verfolgt werden, da die Versuchsbedingungen es nicht ausgeschlossen sein lassen, daß in dem einen Falle die Belichtung etwas intensiver war. Das prinzipiell gleiche Bild ergibt Tabelle VII mit NaF und KBr: auch hier bei kleinen Salzmengen größerer Schutz als bei Zugabe großer Mengen.

Tabelle VII.

	Röhrchen	Hell 1	2	3	4	5	6	7	8	Dunkel 1	2	3	4	5	6	7	8
NaF	A			/	X	✱	✱	✱	✱				/	⋌	X	✱	✱
	B				/	X	✱	✱	✱				/	⋌	X	✱	✱
	C				⋌	✱	✱	✱	✱				/	⋌	X	✱	✱
	D			/	X	✱	✱	✱	✱				/	⋌	X	✱	✱
KBr	A			/	X	✱	✱	✱	✱					/	⋌	✱	✱
	B					/	✱	✱	✱					/	⋌	✱	✱
	C				/	X	✱	✱	✱					/	⋌	✱	✱
	D				/	X	✱	✱	✱					/	⋌	✱	✱

Zur Orientierung sei bemerkt, daß die Phosphatkonzentration in den Lösungen m/40 beträgt, während die Konzentration der Salzlösung n/40 (B), n/20 (C), n/10 (D) ausmacht. Die molare Salzkonzentration überwiegt also die Phosphatkonzentration nur in der Probe D.

In Tabelle VIII sind die Wirkungen der Nitrate und Nitrite verzeichnet. Bei diesen Salzen ist der vorher genannte Mechanismus gar nicht oder nur sehr wenig ausgeprägt. Eine Schutzwirkung findet sich hier ebenfalls, sie zeigt aber keine oder nur geringe Abnahme auf Zusatz weiterer Salzmengen. Inwieweit diese Erscheinung mit der Rolle zusammenhängt, welche besonders die Nitrate für die Amylasen spielen, bleibe dahingestellt.

Tabelle VIII.

	Röhrchen	Hell 1	Hell 2	Hell 3	Hell 4	Hell 5	Hell 6	Hell 7	Hell 8	Dunkel 1	Dunkel 2	Dunkel 3	Dunkel 4	Dunkel 5	Dunkel 6	Dunkel 7	Dunkel 8
$NaNO_3$	A		/	∧	✖	✖	✱	✱	✱				/	∧	✖	✱	✱
	B			/	∧	×	✱	✱	✱				/	∧	✖	✱	✱
	C			/	×	✖	✱	✱	✱				/	∧	✖	✱	✱
	D			/	×	✖	✱	✱	✱				/	∧	✖	✱	✱
KNO_3	A			∧	×	✖	✱	✱	✱				/	×	✖	✱	✱
	B				/	×	✖	✱	✱				/	×	✖	✱	✱
	C				∧	×	✖	✱	✖				/	×	✖	✱	✱
	D				∧	×	✖	✱	✱				/	×	✖	✱	✱
$NaNO_2$	A			/	∧	✖	✱	✱	✱				/	×	✖	✖	✱
	B				/	×	✖	✱	✱				/	×	✖	✖	✱
	C				/	×	✖	✱	✱				/	×	✖	✖	✱
	D				/	×	✖	✱	✱				/	×	✖	✖	✱
KNO_2	A				∧	✖	✖	✱	✱				/	∧	×	✱	✱
	B				∧	✖	✖	✱	✱				/	∧	×	✱	✱
	C				/	×	✖	✱	✱				/	∧	×	✱	✱
	D				/	×	✖	✱	✱				/	∧	×	✱	✱

Alle diese Resultate gelten selbstverständlich nur für die angewandten Versuchsbedingungen. Es hat sich z. B. gezeigt, daß bei größerer Lichtintensität diese Verhältnisse eine Änderung erleiden können. Prinzipiell sind die Ergebnisse, welche mit Malzdiastase gewonnen worden sind, ähnlich. Sie zeigen jedoch nach den bisher ausgeführten Versuchen durchaus nicht die Regelmäßigkeit, die wir bei der Takadiastase fanden, und es wird die Aufgabe weiterer Versuche sein, diese Differenzen zu klären. Auch bei Pankreatin liegen die Dinge schwieriger; es scheint, daß auch hier spezifische Momente weit mehr in den Vordergrund treten, als wir dies bei der Takadiastase gesehen haben.

Literatur.

1) Diese Zeitschr. **134**, 459, 1923. — 2) Zeitschr. f. Biol. **71**, 302, 1920.

Zur Kritik der mikrochemischen Fett- und Cholesterinbestimmung nach Ivar Bang.

Von

Johanna Maas.

(Aus der I. inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses Charlottenburg-Westend.)

(Eingegangen am 22. November 1923.)

In der Hoffnung, ein für die Klinik brauchbares und von den subjektiven Fehlern der kolorimetrischen Methoden freies Verfahren vorzufinden, habe ich mich mit Theorie und Praxis dieser von *Bang* im Jahre 1918 in dieser Zeitschrift publizierten Methode befaßt; meine Hoffnung ist, wie gleich hier gesagt sei, nicht erfüllt worden.

Das Prinzip der Methode beruht auf der Oxydation der zu bestimmenden Fettkörper mit Kaliumbichromat-Schwefelsäure, einem der kräftigsten Oxydationsmittel, über die das chemische Laboratorium zur Zerstörung organischer Substanz verfügt. Allein aus dieser Tatsache erhellt schon, daß nur bei peinlichster Reinhaltung sämtlicher Reagenzien und Materialien auch von Spuren organischer Verunreinigung (Staubteilchen, Fettspuren von den Händen des Untersuchers usw.) die bei der Oxydation gewonnenen Zahlen auf angewandtes Neutralfett oder Cholesterin bezogen werden dürfen. Nach der Vorschrift von *Bang* läßt man 100 bis 130 mg Blut von den bekannten Löschpapierblättchen aufsaugen. In dieser Blutmenge sind normalerweise 0,1 bis 0,2 mg Cholesterin und noch weniger Neutralfett enthalten. Jede organische Verunreinigung, und betrüge sie nur Bruchteile von Milligrammen, wird also bei der Unspezifität des Oxydationsverfahrens Fehler von solcher Größe verursachen müssen, daß die ganze Bestimmung dadurch illusorisch werden würde. Da für eine einzige Fettcholesterinbestimmung immerhin eine Reihe von Reagenzien und Gläsern nötig ist, kann man sich vor den durch minimale Verunreinigungen drohenden Gefahren nur durch die ständige Kontrolle an Leerversuchen schützen. Dabei ergab sich mir folgende Schwierigkeit: Wenn ich neben den mit

Blut vollgesogenen Fließpapierblättchen noch ein leeres zur Kontrollbestimmung mit Petroläther extrahierte, dann lösten sich von dem leeren Blättchen feinste Fäserchen ab und blieben im Petroläther suspendiert. Diese Fäserchen verbrauchten später bei der Oxydation eine so große Menge von Bichromat, daß der Bichromatverbrauch beim Leerversuch erheblich höher wurde als bei den Blutproben und ich schließlich auf den Leerversuch in dieser Form verzichten mußte. Aber auch bei den mit Blut vollgesogenen Fließpapierstückchen ließ sich eine geringe Abfaserung naturgemäß nicht völlig ausschließen.

Der genauere Verlauf des Oxydationsprozesses ist bei dem Bichromat-Schwefelsäureverfahren nicht bekannt. *Bang* hat in großen Versuchsreihen gefunden, daß der Prozeß niemals bis zur quantitativen Verbrennung zu Kohlendioxyd und Wasser fortschreitet, sondern schon erheblich früher sistiert. Er hat dann aus seinen Reihenversuchen den empirischen Faktor 2,45 errechnet, d. h. 1 mg Triolein verbraucht unter den von ihm beobachteten Bedingungen 2,45 ccm n/10 Bichromat in konzentrierter Schwefelsäure. Wem es nun nicht glückt, die *Bang*schen Versuchsbedingungen einwandfrei zu reproduzieren, der muß damit rechnen, daß die Oxydation an einem anderen Punkte stehen bleibt und der Faktor 2,45 nicht mehr stimmt. *Bang* verwendet für die Reaktion einzig die bei der Mischung der n/10 Bichromatlösung mit konzentrierter Schwefelsäure entstehende Wärme und verwirft jede weitere Wärmezufuhr oder Abkühlung. Er mischt die Reagenzien im Probierglase und läßt das Probierglas stehen, bis es Zimmertemperatur erreicht hat. Nun ist aber klar, daß die erreichte Mischungswärme und damit auch die Reaktionsintensität abhängig sein muß 1. von der gleichmäßigen Wasserfreiheit der konzentrierten Schwefelsäure (eine Bedingung, die beim Versuch nicht ganz leicht zu erfüllen ist), 2. von der ursprünglichen Temperatur der Reagenzien, also von der Zimmertemperatur, die doch auch in Laboratorien erheblichen Schwankungen ausgesetzt sein kann, 3. von der Schnelligkeit der Abkühlung, die wiederum zunächst von der Außentemperatur und außerdem vom Verhältnis der Masse des Reaktionsgemisches zu seiner Oberfläche abhängig ist; so daß also das Resultat bei Verwendung eines Becherglases an Stelle des Probierglases ganz anders ausfallen und zu niedrigeren Werten führen müßte — wie denn auch meine Versuche bestätigt haben. Man sieht also, daß die gleichmäßige Leitung des Oxydationsprozesses mit sehr erheblichen Schwierigkeiten verknüpft ist. Mir ist es auch bei exaktestem Arbeiten mit reiner Trioleinlösung nicht geglückt, regelmäßig brauchbare Resultate innerhalb der erlaubten Fehlergrenzen zu erhalten; dazu kommt, daß bei der Rücktitration des durch die überschüssige Chromsäure gefällten Jods mit Thiosulfat mit einem Ablesungsfehler von $\pm 0{,}02$ ccm gerechnet werden

muß; das liegt in der Natur des Titrationsverfahrens. 0,02 ccm entsprechen fast 0,01 mg Triolein; bei einer angewandten Menge von 0,1 bis 0,2 mg also schon 5 bis 10 Proz.

Analysen.

0,15 mg Triolein verbrauchen:

a) im Becherglas:

1.	0,26 ccm Bichromat,	entsprechend	0,107 mg Triolein,
2.	0,31 „	„	0,127 „ „

b) im Probierglas:

1.	0,30 ccm Bichromat,	entsprechend	0,122 mg Triolein,
2.	0,34 „	„	0,138 „ „

0,25 mg Triolein verbrauchen:

1.	0,6 ccm Bichromat,	entsprechend	0,248 mg Triolein,
2.	0,55 „	„	0,224 „ „

Erheblich größer werden aber die Fehlermöglichkeiten, wenn man von der Bestimmung des reinen Trioleins zu der des Cholesterins neben Neutralfett übergeht. Das Cholesterin wird aus der Differenz der vor und nach Digitoninfällung vorhandenen oxydablen Substanz bestimmt, ist also mit den unter Umständen additiven Fehlern beider Bestimmungen belastet.

0,1 mg Triolein + 0,176 mg Cholesterin = 0,276 mg verbrauchen bei Oxydation im Becherglas:

1.	0,43 ccm Bichromat,	entsprechend	0,155 mg,
2.	0,45 „	„	0,183 „

bei Oxydation im Probierglas:

1.	0,68 ccm Bichromat,	entsprechend	0,277 mg,
2.	0,68 „	„	0,277 „

0,1 mg Triolein + 0,05 mg Cholesterin = 0,150 mg verbrauchen bei Oxydation im Probierglas:

1.	0,29 ccm Bichromat,	entsprechend	0,118 mg,
2.	0,24 „	„	0,100 „

Differenzbestimmung.

Angewandt 0,2 mg Triolein + 0,1 mg Cholesterin.

Triolein + Cholesterin verbrauchen:

im Becherglas:	0,67 ccm Bichromat,	entsprechend	0,275 mg
im Probierglas:	0,80 „	„	0,326 „

Triolein nach Digitoninfällung verbraucht:

im Becherglas:	0,47 ccm Bichromat,	entsprechend	0,192 mg
im Probierglas:	0,44 „	„	0,179 „

daraus berechnetes Cholesterin:

im Becherglas . . . 0,083 mg,
im Probierglas . . . 0,147 „

also für Cholesterin völlig ungenügende Resultate.

Im Band 136 dieser Zeitschrift, der vor kurzem erschienen ist, gibt *Szent-Györgyi* eine sehr weitgehende Modifikation der *Bang*schen Methode an, die die oben aufgezählten Fehlerquellen vermeidet. Es bleibt abzuwarten, inwieweit das zunächst nur an reinem Cholesterin ausprobierte, sehr subtile Verfahren sich für die Klinik wird nutzbar machen lassen.

Biochemische Zeitschrift

Unter Mitwirkung von

herausgegeben von

C. Neuberg-Berlin

Hundertvierundvierzigster Band

Fünftes und sechstes Heft

Ausgegeben am 30. Januar 1924



Berlin

Verlag von Julius Springer

1924

Die

Biochemische Zeitschrift

erscheint in zwanglosen Heften, die in kurzer Folge zur Ausgabe gelangen; je sechs Hefte bilden einen Band im Umfange von 36—40 Bogen.

In der Regel können Originalarbeiten nur Aufnahme finden, wenn sie nicht mehr als $1^1/_2$ Druckbogen umfassen. Sie werden mit dem Datum des Eingangs versehen und der Reihe nach veröffentlicht, sofern die Verfasser die Korrekturen rechtzeitig erledigen. — Mitteilungen polemischen Inhalts werden nur dann zugelassen, wenn sie eine tatsächliche Richtigstellung enthalten und höchstens zwei Druckseiten einnehmen.

Manuskriptsendungen sind an den Herausgeber,

Herrn Prof. Dr. C. Neuberg, Berlin-Dahlem, Hittorfstr. 18,

zu richten.

Die Verfasser erhalten bis 100 Sonderabdrucke ihrer Abhandlungen kostenfrei bis zu einem Umfang von $1^1/_2$ Druckbogen, von größeren Arbeiten nur bis 75. Doch bittet der Verlag, nur die zur tatsächlichen Verwendung benötigten Exemplare zu bestellen. Über die Freiexemplare hinaus bestellte Sonderdrucke werden berechnet. Die Herren Mitarbeiter werden jedoch in ihrem eigenen Interesse dringend gebeten, sich, wenn irgend möglich, mit der kostenfrei zur Verfügung gestellten Anzahl zu begnügen, und falls mehr Exemplare unbedingt erforderlich sind, deren Kosten vorher vom Verlage zu erfragen, um unliebsame Überraschungen zu vermeiden.

Verlagsbuchhandlung Julius Springer

Berlin W 9, Linkstraße 23/24.

144. Band. **Inhaltsverzeichnis.** Heft 5/6.

Seite

Hammarsten, Einar. Zur Kenntnis der biologischen Bedeutung der Nucleinsäureverbindungen 383

Lüers, Heinrich und Michael Siegert. Zur Kenntnis der Proteine des Hafers 467

Stasiak, A. Cholesterin- und Bicarbonatgehalt des Blutes im Verlaufe experimenteller Nierenerkrankungen 477

Hagihara, Jitsuichi. Über den Einfluß von Kolloiden auf Fermente. III 482

Rona, P., C. van Eweyk und M. Tennenbaum. Über die Wirkung der Alkaloide aus der Atropin-, Cocain- und Morphingruppe auf die Hefe-Invertase 490

Jendrassik, L. Humorale Übertragbarkeit von Nervenreizen beim Warmblüter 520

Keeser, E. Adsorption und Arzneimittelverteilung im Organismus. III 536

Fortsetzung des Inhaltsverzeichnisses siehe 3. Umschlagseite.

Zur Kenntnis der biologischen Bedeutung der Nucleinsäureverbindungen.

Von

Einar Hammarsten.

(Aus der physiologisch-chemischen Abteilung des Karolinischen Instituts zu Stockholm.)

(Eingegangen am 19. November 1923.)

Mit 21 Abbildungen im Text.

Abteilung I.

Einleitung.

Die für das Leben notwendige Heterogenität der Zelle kann von dem Gesichtspunkte einer ungleichmäßigen Wasserverteilung aus betrachtet werden. Konzentrationsgefälle sind in kolloiden Lösungen wohlbekannt, und sowohl aus den allgemeinen Eigenschaften der Kolloide als aus dem wechselnden Aussehen der Zellen im mikroskopischen Bilde muß man schließen, daß im Inneren der Zelle kolloidreiche Phasen sich im Gleichgewicht mit kolloidärmeren befinden, und daß während der Lebensprozesse starke Verschiebungen in diesem Gleichgewichte zustande kommen.

Granula- und Vakuolbildung, Auflösung und Ansammlung in formierte Körper, die einer Bewegung mächtig sind, Traktionsfäden, die sich verkürzen, um einige Beispiele zu nennen, alles muß von Änderungen in der Richtung der treibenden Kräfte Diffusion, Hydratations- und Löslichkeitsgrad, Oberflächenspannung abhängen. Die notwendige Voraussetzung, um Umwandlungen in der Zelle zu verstehen, ist natürlich die Kenntnis der chemischen und physikalischen Eigenschaften der einzelnen Zellbestandteile. Man muß also, um die nächsten Ursachen zur labilen Heterogenität der Zellen erklären zu können, die Eigenschaften der Zellsubstanzen in Lösung unter Bedingungen, die in der lebenden Zelle möglich sind, kennenlernen.

Seit *J. Sjöqvists* (1) für die moderne Eiweißforschung grundlegender Entdeckung des amphoteren Charakters der Eiweißstoffe sind durch die Arbeiten von *S. P. L. Sörensen* (2), *L. Michaelis* (3), *W. Pauli* (4), *J. Loeb* (5), *Procter* (6), *Procter* und *Wilson* (7) und anderen die Zustandsänderungen in Eiweißlösungen bei Variationen in Wasserstoff- und Salzionenkonzentration in wichtigen Punkten aufgeklärt worden. Die Auffassung über die Eiweißstoffe in Lösung geht ja nunmehr einstimmig in der Richtung, daß die Eiweißstoffe den gewöhnlichen stöchiometrischen und den Gasgesetzen (2) folgen, wodurch ein fester Boden für das Verständnis der Eigenschaften der Eiweißstoffe in den Zellen geschaffen ist.

Aus biologischem Gesichtspunkte von der allergrößten Bedeutung ist die Anwendung des Donnangesetzes (8) von *Procter* (6) und *Procter* und *Wilson* (7) auf den osmotischen Druck und die Schwellung, eine Anwendung, die von *Loeb* (5) weiter verfolgt worden ist. Die Anwendung des Donnangesetzes ermöglicht nach diesen Verfassern eine mathematische Ausdrucksweise für die Abhängigkeit des osmotischen Druckes der Eiweißlösungen von den Konzentrationen an Wasserstoff- und Neutralsalz-ionen. Die innere Reibung, also der Hydratationsgrad in Eiweißlösungen, ist ja nach *Pauli* (4) durch dieselben Faktoren reguliert und würde nach *Loeb* (5) eine osmotische Erscheinung sein, die sich nach *Donnans* Gesetz berechnen ließe.

Dasselbe muß auch für Salze mit einem schwer diffusiblen Ion gelten, da in solchem Falle bei Gegenwart von anderen Salzen mit diffusiblen Ionen die Bedingungen für einen Donnaneffekt gegeben sind. Insofern als die Eiweißstoffe Salze in dem Zellsaft bilden oder andere Salze mit einem schwer diffusiblen Ion da vorhanden sind, kann man zusammenfassend sagen, daß die Wasserverteilung, die Heterogenität, in bezug auf diese Stoffe durch die Wasserstoffionenkonzentration und den Gehalt an Neutralsalzen reguliert ist.

Die sogenannten neutralen Eiweißstoffe zeigen nach *Loeb* (5) nur in erheblicher Entfernung von ihren isoelektrischen Gebieten einen bedeutenden Donnaneffekt. Basische Eiweißstoffe oder relativ starke Säuren, wie die Nucleinsäuren, die neutrale Salze bilden können, zeigen dagegen einen starken Donnaneffekt auch bei neutraler Reaktion. Wenn ein Eiweißstoff seinen isoelektrischen Punkt bei $p_H = 4$ bis 5 hat, kann jedenfalls ein Donnaneffekt bei $p_H =$ ungefähr 7 zustande kommen, der jedoch im Vergleich mit demjenigen bei dem Natriumsalz der Thymonucleinsäure unbedeutend ist.

Eiweißstoffe mit ihrem isoelektrischen Punkte in der Nähe von der Reaktion des Zellsaftes können in den Zellen keinen starken Donnaneffekt zeigen und können nur wenig von Änderungen im Gehalt an Neutralsalzen beeinflußt werden, weil sie eben bei isoelektrischer

Reaktion keine Salze bilden. Basische Eiweißstoffe und Nucleinsäuren dagegen müssen bei einer Reaktion in der Nähe von dem wirklichen Neutralpunkte, wo sie in Lösung als Salze vorkommen, einen sehr bedeutenden Donnaneffekt zeigen und deshalb für Veränderungen in der Konzentration der Neutralsalze hinsichtlich der Wasserverteilung sehr empfindlich sein.

Da im Zellprotoplasma in erster Annäherung neutrale Eiweißstoffe sich bei fast neutraler Reaktion befinden, in den Zellkernen aber immer eine relativ starke Säure, Nucleinsäure, einstweilen basische Eiweißkörper, Histone, Protamine, vorhanden sind, welche bei neutraler Reaktion ausgiebige Salzbildung geben, so folgt aus dem oben Gesagten, daß man im Zellkern im Vergleich mit dem Protoplasma eine sehr große Labilität hinsichtlich der Wasserverteilung zu erwarten hat. Die Histologie hat hierfür den Ausdruck gefunden, daß der Kern ein Primus Motor für die Zelle ist. Es ist in diesem Zusammenhang interessant zu sehen, welche *Änderung die Labilität der Wasserverteilung im Protoplasma erfährt, wenn die Bedingungen für Salzbildung im Eiweiß erfüllt werden, wie dies bei der Milchsäurebildung in den Muskeln geschieht. Es scheint mir berechtigt zu sein, einen direkten Vergleich der Rolle der Milchsäure in den Muskeln und der Nucleinsäuren in den Zellkernen hinsichtlich des großen Einflusses beider auf die Labilität der Wasserverschiebung zu machen.*

Da die Nucleinsäuren relativ starke Säuren sind, muß angenommen werden, daß sie als Salze mit den basischen Substanzen im Zellkern vorkommen, also als Salze mit Eiweiß und eventuell dessen Abbauprodukten, mit Natrium und anderen disponiblen Kationen. Die im Tierkörper gewöhnlichste Nucleinsäure, die Thymonucleinsäure, ist, wie *Steudel* (9) einwandsfrei gezeigt hat, vierbasisch (abgesehen von den zwei äußerst schwach sauren Affinitäten, die von *Feulgen* (10) entdeckt sind). Von ihren Dissoziationskonstanten (den scheinbaren) ist, wie ich gezeigt habe, die erste etwa 200mal größer, die vierte etwa halb so groß wie die der Essigsäure. Die hochviskösen Salze dieser Säure auch mit ziemlich schwachen Basen können also in Lösung nur wenig hydrolysiert sein, und man muß erwarten, daß ihre Salze in Hinsicht auf osmotischen Druck und Viskosität gegen andere Ionen sehr empfindlich sein müssen. Die kleinsten Änderungen in dem Salzgehalt des Zellkerns, wie sie zweifelsohne vorkommen, müssen demnach große Verschiebungen in der Wasserverteilung im Kern bewirken. Die Gegenwart einer relativ starken Säure im Kern muß also demselben andere Eigenschaften verleihen als die des Protoplasmas, Eigenschaften, die möglicherweise die im Mikroskop beobachtete große Veränderlichkeit des Kernes erklären könnten. Um aber mit einiger Wahrscheinlichkeit die auffälligen Formänderungen der nucleinsäurehaltigen Chromo-

somen auf Nucleinsäuresalze zurückführen zu können, müßte es gezeigt werden, daß solche Salze für äußerst kleine Milieuänderungen mit wirklichen Sprüngen in dem osmotischen Druck, Viskosität und eventuell anderen Eigenschaften antworteten; *daß ihnen in diesen Hinsichten eine Labilität von einer ganz anderen Größenordnung als den neutralen Eiweißkörpern zukäme.* Im folgenden wird gezeigt werden, daß diese Vermutung sich als richtig erwiesen hat.

Abteilung II.

Präparierungen von Ausgangsmaterialien und Methodisches.

Das Natriumsalz der Thymonucleinsäure (Na_4-T.).

Das Natriumsalz der Thymonucleinsäure wurde nach einer von *I. Bang* (11) in der Hauptsache angegebenen Methode hergestellt. Alle Präparationen wurden bei $+1$ bis 0^0 C ausgeführt und die Reaktion war die ganze Zeit gegen Lackmus neutral. 3 kg Thymus wurden 1 Stunde nach dem Schlachten fein verteilt, dreimal mit 15 Litern destillierten Wassers jedesmal 12 Stunden bei 0^0 extrahiert. Während der ersten Extraktion ging sehr wenig in Lösung, nach der dritten aber waren nur einzelne Brocken ungelöst. Die gesammelten Extrakte wurden mit Calciumchloridlösung bis zu maximaler Fällung versetzt, dekantiert, die Fällung in einem großen Separatorzylinder (10 Liter Raum) abzentrifugiert (6000 Touren in der Minute), in Wasser suspendiert und nochmals zentrifugiert. Die Fällung wurde dann in 10proz. Kochsalz gelöst, die milchige, klebrige Lösung mit Kochsalz gesättigt und zu ungefähr 30 Liter mit gesättigter Kochsalzlösung verdünnt. Diese ziemlich dünne Flüssigkeit wurde nach 3 Tagen auf doppelte, gefaltete Filter gegossen und filtrierte in drei Tagen vollständig. Das Filtrat war völlig farblos, klar und stark viskös. Es wurde in dünnem Strahl in $1\frac{1}{2}$ Vol. Alkohol gegossen, wobei mit einem Holzstab lebhaft gerührt wurde. Das Natriumsalz der Thymonucleinsäure setzte sich an dem Stabe als eine schneeweiße Spule einer fadenförmigen Masse ab. Die Fällung wurde abgepreßt, in Wasser gelöst, mit 4 Vol. Alkohol gefällt, die Fällung nochmals in Wasser gelöst und die etwa 2proz. Lösung mit 4 Vol. Alkohol versetzt. Die schwach opaleszente Lösung wurde mit ein wenig einer 10proz. Kochsalzlösung versetzt, die fadenförmige Fällung sofort auf einen Stab aus der Lösung gewickelt, abgepreßt, mehrmals mit einer Mischung von 7 Teilen Alkohol und 3 Teilen Wasser gewaschen, mit Alkohol und Äther getrocknet und lufttrocken aufbewahrt. Das Präparat war schneeweiß und von einer eigentümlichen, Schießbaumwolle ähnlichen Konsistenz. Ungefähre Ausbeute: Aus 7 kg Thymus 140 g Natriumsalz der Thymonucleinsäure.

Die Analysen auf Stickstoff, Phosphor und Natrium gaben die folgenden Werte:

0,0911 g	entsprachen	21,75 ccm	28,02 n HCl	=	11,94 Proz.	N
0,0559 g	„	13,32 „	28,02 „	=	11,91 „	N
0,0743 g	„	17,92 „	28,02 „	=	12,06 „	N
			Mittel	=	11,97 Proz.	N
0,3525 g	gaben	0,0883 g	$Mg_2P_2O_7$	=	6,97 Proz.	P
0,2922 g	„	0,0739 g	„	=	7,04 „	P
0,2162 g	„	0,0565 g	„	=	7,27 „	P
			Mittel	=	7,09 Proz.	P
1,2036 g	gaben	0,2192 g	Na_2SO_4	=	5,90 Proz.	Na
1,0447 g	„	0,1880 g	„	=	5,83 „	„
1,0181 g	„	0,1806 g	„	=	5,74 „	„
			Mittel	=	5,83 Proz.	Na

Berechnet für	Gefunden
$\frac{15\,N}{4\,P} = 1{,}69,$	$\frac{N}{P} = 1{,}68,$
$\frac{4\,P}{4\,Na} = 1{,}34,$	$\frac{P}{Na} = 1{,}22.$

Das Präparat bestand also aus dem vierbasischen Natriumsalz der Thymonucleinsäure. Eine 1proz. Lösung (mit 120 mg N auf 100 ccm) zeigte einen Gehalt an Cl-Ionen, in Quecksilber-Kalomelkette gemessen, von 0,00013 Normalität. In der Asche von 1 g konnte maßanalytisch kein Calcium nachgewiesen werden. Dagegen war es nicht gelungen, das Präparat absolut eiweißfrei zu machen. Eine 2proz. Lösung gab nach Zusatz von Alkali und Kupfersulfat ein Filtrat, das in einer 10 cm hohen Schicht eine äußerst schwache rosa Farbe zeigte. Ich habe versucht, die Menge Eiweiß durch Vergleich mit der Biuretfarbe verdünnter Lösungen von Hühneralbumin und sogenanntem Wittepepton zu schätzen.

Nr.:	1	2	3	4	5	6
Mg Eiweiß-N auf 100 ccm	0,25	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0

Die Biuretprobe wurde in den beiden Eiweißlösungen und in der Lösung des Natriumsalzes der Thymonucleinsäure (Na_4-T.) (240 mg Stickstoff auf 100 ccm = 2proz. Lösung von Na_4-T.) in genau derselben Weise ausgeführt. Alle Proben wurden filtriert und in 10 cm hoher Schicht beobachtet. Die Farbenstufe der Na_4-T.-Lösung lag am nächsten zwischen Nr. 1 und 2. Weniger als 0,2 Proz. des Stickstoffs im Präparat würde demnach aus Eiweißstickstoff bestehen. Da außerdem das Molekülgewicht des Eiweißes jedenfalls nicht kleiner als das der Nucleinsäure ist, so kann eine Verunreinigung mit prozentisch so geringer molarer Konzentration als Masse keine Rolle spielen. Höchst unwahrscheinlich ist die Möglichkeit, daß die qualitativen Eigen-

schaften der Nucleinsäuresalze durch die winzige Verunreinigung mit Eiweiß beeinflußt werden könnten. Jedenfalls habe ich diese Möglichkeit der denaturierenden Alkalieinwirkung der *Neumann*schen (12) Methode vorgezogen[1]).

Die freie Thymonucleinsäure.

2 g Na_4-T. wurden in 100 ccm Wasser gelöst und gleichzeitig 0,5 Liter n/3 Salzsäure in Wasser, 1 Liter n/3 Salzsäure in Alkohol und 2 Liter Alkohol-Wassermischung (7 : 3) bereitet. Wenn alle Lösungen auf 0° abgekühlt waren, wurde die Na_4-T.-Lösung in dünnem Strahl in die lebhaft gerührte wässerige Salzsäurelösung gegossen und die ganze Flüssigkeit schnell mit 1 Liter Salzsäure-Alkohol versetzt. Wenn man Alkohol nicht sofort zusetzte, wurde nämlich die ausgefällte Nucleinsäure klebrig und konnte nicht gut ausgewaschen werden. Die Flüssigkeit wurde so schnell wie möglich auf der Nutsche von der flockigen Fällung filtriert, mit 2 Liter der Alkohol-Wassermischung gewaschen und dann mit Alkohol und Äther getrocknet. Die Präparation bis zum Beginn der Waschung pflegte nicht mehr als 12 Minuten zu dauern. Wie Messungen der Wasserstoffionenkonzentrationen und Interferometerwerte gezeigt haben, wirken kleine Konzentrationen Salzsäure bei Zimmertemperatur nicht einmal in einigen Stunden spaltend auf die freie Nucleinsäure in Wasserlösung.

Die in dieser Weise hergestellte Nucleinsäure kann mit großer Wahrscheinlichkeit als unzersetzt betrachtet werden.

2 g der freien Säure wurden verbrannt und die glasige Asche auf Natrium mit negativem Resultat geprüft. Das Präparat war blendend weiß und locker. Es löste sich bei Schüttelung mit Wasser zu einer ziemlich stabilen kolloiden Suspension, die bei elektrometrischer Messung sich als Cl-Ionenfrei erwies. Die Analyse auf Stickstoff und Phosphor gab ein Verhältnis N/P = 1,71.

Lysinchlorid wurde aus reinem Lysinpikrat (aus Hornsubstanz von *K. Mörner* dargestellt) über das Sulfat gewonnen.

Amine.

Trimethyl- und Triäthylamin (*Kahlbaum*) wurden nach *François* (13) in Lösung mit Quecksilberoxyd von Ammoniak gereinigt und kohlensäurefrei aus alkalischer Lösung destilliert. Das Destillat gab mit

[1]) Neulich ist es mir gelungen, ein Präparat von Na_4-T. nach der oben beschriebenen Methode herzustellen, das in 2proz. Lösung keine Biuretreaktion gab. Die einzige Verschiedenheit in der Herstellungsweise war, daß die mit Kochsalz gesättigte Flüssigkeit vor der Filtrierung eine Woche bei 0° stehengelassen worden war.

Nesslers Reagens keine Reaktion auf Ammoniak. Tetramethylammoniumhydrat wurde in methylalkoholischer Lösung in bekannter Weise aus Methyljodid und Methylamin hergestellt. Die Base wurde durch Schüttelung mit Silberoxyd frei gemacht und die klare, silber- und jodfreie Lösung kohlensäurefrei abgehebert.

Eiweißkörper.

Histon wurde nach *Kossel* (14) präpariert, dreimal mit Ammoniak gefällt und gegen n/1000 Salzsäure mehrere Wochen dialysiert, bis die Histonchloridlösung phosphorfrei war. Das Chlorid wurde dann aus salzsaurer Lösung mit Alkohol gefällt und mit Alkohol und Äther getrocknet.

Die Analyse des lufttrockenen Präparates ergab 6,24 Proz. Cl und 16,08 Proz. N. Es zeigte sich weiter, daß eine Menge Natronlauge, entsprechend 54,5 Proz. des Chlorgehaltes, zugesetzt werden mußte, um einer 1- bis 2proz. Lösung ein $p_H = 6{,}9$ zu geben (kolorimetrische, Dibromthymolsulfophthalein, und elektrometrische Messungen gaben gute Übereinstimmung).

Protamin wurde aus Heringssperma hergestellt, das am Fangorte der Heringe nach *Kossel* (15) mit Wasser extrahiert, geseiht, mit Essigsäure gefällt und mit Alkohol und Äther getrocknet worden war. Das Protamin wurde zweimal als Pikrat gefällt und zuletzt das Sulfat als Öl dreimal aus Wasserlösung abgeschieden. Die völlig ungefärbte Lösung des Sulfats, die für die Präparation der Nucleinsäureverbindungen gebraucht wurde, enthielt 7,4 g Stickstoff auf 100 ccm und war 0,08 äquivalent-normal in bezug auf Schwefelsäure. Um p_H 6,9 zu erreichen (wie beim Histonchlorid bestimmt), waren 4 ccm n/10 Natronlauge auf 100 ccm der Lösung nötig.

Hühneralbumin wurde nach *Sörensen* (2) dreimal kristallisiert und 4 Wochen unter 2 m Wasserdruck bei schwach saurer Reaktion (p_H ungefähr 4) und dann 2 Wochen bei isoelektrischer Reaktion ($p_H = 4{,}8$) dialysiert.

Alle Eiweißlösungen waren phosphorfrei.

Die Stickstoffbestimmungen wurden nach *Kjeldahl* ausgeführt. Bei der Destillation wurde kohlensäurefreie Natronlauge verwendet, und bei der Titration n/10 HCl und n/28,02 NaOH mit einer Mischung von Methylrot und Methylenblau als Indikator (nach *Sörensen*). Der Umschlag war auf weniger als einen Tropfen scharf. Überall wurden mindestens zwei Bestimmungen gemacht, oft vier. Die angeführten Zahlen sind die Mittelzahlen. In den Tabellen sind sie für die Nucleinsäure gewöhnlich in Molarität umgerechnet, wobei 15 g-Atome Stickstoff mit 1 g-Mol. Nucleinsäure gleichgesetzt wurden.

Die Bestimmungen von Phosphor, Chlor und Schwefelsäure wurden nach Schmelzung mit Alkali und Nitrat in den gelösten Schmelzen, Phosphor nach *Woy* (16), Chlor nach *Volhard* und Schwefelsäure gravimetrisch als Bariumsulfat in üblicher Weise ausgeführt.

Die Abmessungen von Lösungen des Na_4-T. geschahen infolge der hohen Viskosität entweder durch Wägung und Reduzierung auf Kubikmaß oder durch Abpipettierung und Ausspülung der Pipetten. Alle Meßgeräte wurden durch Auswägung mit Wasser korrigiert.

Die osmotischen Messungen wurden mit der Kompensationsmethode nach *Sörensen* (2) ausgeführt. Diese Methode wurde, wo nicht anders bemerkt, in allen Einzelheiten befolgt. Die Ablesungen der Meniskusschwankungen wurden im Kathetometermikroskop auf 0,01 mm gemacht. Die Permeabilität der angewandten Kollodiumhülsen (*Sörensen*) konnte wenigstens einigermaßen gleichförmig reproduziert werden. Beim Gießen des Kollodiums auf die rotierende Röhre war die Geschwindigkeit 60 Umdrehungen pro Minute, der Neigungswinkel der Röhre 30°, die Dicke des Kollodiumstrahles etwa 4 mm im Durchmesser und die Trocknungszeit 8 Minuten zwischen jedem Aufguß und $1^3/_4$ Stunden nach dem vierten und letzten Aufguß. Solche Kollodiumhülsen von 10 bis 200 ccm Inhalt wurden für Osmose- und Dialyseversuche gebraucht. In den Dialyseversuchen für präparative Zwecke wurden die Hülsen, wie Abb. 1 zeigt, montiert. Durch den großen Gegendruck von 2 m Wasser wurde eine Verdünnung sehr bequem verhindert und sogar starke Konzentrierungen, z. B. bei den Histon-Nucleinsäureverbindungen, ermöglicht.

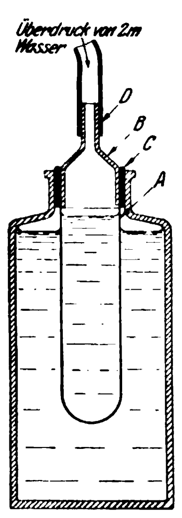


Abb. 1.

Bei den Gefrierpunktsmessungen wurden die Mittelwerte von drei bis vier unmittelbar nacheinander ausgeführten, auf 0,001 bis 0,002° übereinstimmenden Messungen genommen.

Für die Bestimmungen der Leitfähigkeit wurden acht Elektroden mit passend variierten Widerstandskapazitäten benutzt. Die Widerstandskapazitäten wurden bei allen Messungen neu kontrolliert.

Die relative innere Reibung wurde als die Verhältnisse zwischen den Produkten der Ausflußzeiten und spezifischen Gewichten der Lösungen und von Wasser angegeben. Die Ausflußzeiten wurden mit Oswaldviskosimetern bei freiwilligem Fließen gemessen.

Die spezifischen Gewichte wurden mittels Pyknometerbestimmungen oder mit *Westfals* Wage erhalten.

Für die Bestimmungen der Wasserstoffionenkonzentrationen wurde die gewöhnliche Aufstellung gebraucht (gesättigte Kalomelelektrode).

Die Chlorionenkonzentrationen wurden in Quecksilberkalomelkette gemessen mit den Versuchslösungen als Verbindungsflüssigkeiten.

Die Interferometerzahlen beziehen sich auf das von *Löwe* gebaute Flüssigkeitsinterferometer (*Zeiss*).

Die Bestimmungen des osmotischen Druckes, der Leitfähigkeit, der relativen inneren Reibung und der Dialysegleichgewichte wurden bei 20° in Thermostaten gemacht, die auf $\pm 0{,}01^0$ genau reguliert waren. Die Messungen der Ionenkonzentrationen wurden bei Temperaturen, die nur einige Zehntelgrade von 20° abweichen konnten, ausgeführt.

Abteilung III.

Dissoziationsgleichgewichte der freien Thymonucleinsäure und des neutralen Natriumsalzes.

Die frisch ausgefällte Nucleinsäure bildete bei Schüttelung mit Wasser eine milchweiße Flüssigkeit von saurer Reaktion. Im Ultramikroskop waren zahlreiche lebhaft bewegliche Partikeln sichtbar, die oft aus kleineren oder größeren Aggregaten bestanden. Die Löslichkeit der lufttrockenen, ausgefällten Säure in Wasser nahm schon nach einigen Tagen von ungefähr $3 \, . \, 10^{-3}$ Molarität bis auf kaum bestimmbare Spuren ab. Ließ man die ausgefällte Säure mit weniger Wasser als zur Lösung erforderlich war stehen, so fingen die ungelösten Klumpen nach etwa 2 Tagen an stark zu quellen, um zuletzt vollständig in Lösung zu gehen. Diese Lösung war viskös, völlig klar und stark sauer. Phosphorsäure konnte darin mit Magnesiamixtur nicht nachgewiesen werden. Ich habe noch nicht untersucht, welche Umwandlung eventuell stattgefunden hatte. Die frischen Lösungen der Säure in Wasser waren ziemlich stabil, indem sie sich in bezug auf osmotischen Druck, Leitvermögen, Wasserstoffionenkonzentration und Interferometerwert innerhalb 2 Tagen nach der Bereitung der Lösungen nicht änderten. Die Wasserlösung wurde von Salzsäure gefällt, aber erst bei beträchtlichem Überschuß. Bei kleinen Salzsäurekonzentrationen, die makroskopisch noch nicht fällend wirkten, blieben die Interferometerwerte in einigen Stunden konstant, um dann langsam zu steigen. Es war also möglich, die Wasserstoffionenkonzentrationen in schwach salzsauren Nucleinsäurelösungen zu messen, ohne während der Messung Zersetzung der Nucleinsäure zu riskieren. Dank der nicht unbedeutenden Löslichkeit der Nucleinsäure und der Haltbarkeit des Moleküls in salzsaurer Lösung war es möglich, die Dissoziationskonstanten der vierbasischen Säure einigermaßen genau zu ermitteln. Am richtigsten ist wohl hier, von scheinbaren Konstanten zu reden, denn wahrscheinlich sind die im Ultramikroskop sichtbaren Partikeln Aggregate von undissoziierten Molekülen. Der Zusatz von Salzsäure vermehrte die Menge derselben, was im Ultramikroskop direkt sichtbar war. Gleichzeitig wurde die

Dissoziation der Nucleinsäure zurückgedrängt, um bei einer Nucleinsäurekonzentration von $1{,}32 \cdot 10^{-3}$ und einer C_{Cl} von $7{,}4 \cdot 10^{-3}$ unbedeutend zu werden.

Die Thymonucleinsäure ist eine vierbasische Säure. Dies ist in den Arbeiten von *Steudel* (9) endgültig festgestellt worden. (Hier wird von den äußerst schwach sauren Affinitäten, die *Feulgen* (10) gefunden hat, abgesehen.)

Man kann nun von vornherein erwarten, daß die vier Dissoziationskonstanten ziemlich nahe aneinander liegen müssen, denn die Säure wird allgemein als eine Polyphosphorsäure betrachtet, wo wahrscheinlich jede der vier Phosphorsäuregruppen nur ein Wasserstoffion liefert.

Tabelle I.

Dissoziationskonstanten der Thymonucleinsäure.

$C \cdot 10^3$	$C_{Cl} \cdot 10^3$	$C_H \cdot 10^3$	$k_1 \cdot 10^3$	$C \cdot 10^3$	$C_{Cl} \cdot 10^3$	$C_H \cdot 10^3$	$k_3 \cdot 10^5$
1,32	7,40	7,89	4,7	0,75	—	0,81	5,3
1,33	6,50	6,81	2,1	0,65	—	0,72	2,8
1,35	5,62	6,17	4,2	0,55	—	0,63	2,2
1,09	4,85	5,37	4,9	0,45	—	0,55	4,6
1,37	4,07	4,70	4,0	0,67	—	0,72	(— 4,3!)
1,11	3,41	3,96	3,9	1,95	1,95	0,50	5,2
1,11	3,71	4,24	3,9	1,95	1,60	0,67	7,3
1,12	2,54	3,27	6,1	1,97	1,47	0,74	7,1
1,13	1,90	2,58	3,9	—	—	—	—
1,88	1,00	2,30	5,2	—	—	—	—
1,90	0,91	2,18	4,4	—	—	—	—
1,92	0,80	2,12	4,7	—	—	—	—
			$k_2 \cdot 10^4$			$C_H \cdot 10^6$	$k_4 \cdot 10^6$
1,94	0,70	2,14	1,9	7,67	26,0	9,31	10,4
2,00	0,44	1,99	2,2	5,96	20,8	4,37	5,4
2,03	0,27	1,94	3,2	7,24	26,8	2,85	7,6
2,07	0,12	1,86	3,2	5,91	22,4	1,57	6,3
2,08	0,04	1,84	3,8	7,63	30,1	0,32	5,0
2,79	—	2,04	1,4	—	—	—	—
2,20	—	1,79	2,4	—	—	—	—
2,01	—	1,63	1,5	—	—	—	—
2,09	—	1,72	2,3	—	—	—	—
1,67	—	1,43	1,8	—	—	—	—
1,15	—	1,06	1,5	—	—	—	—
1,12	—	1,03	1,3	—	—	—	—

$$k_1 = \frac{C_H (C_H - C_{Cl})}{C - (C_H - C_{Cl})} = 4{,}8 \cdot 10^{-3},$$

$$k_2 = \frac{C_H [C_H (C_H - Cl) + k_1 (C_H - C_{Cl} - C)]}{k_1 [2C - (C_H - C_{Cl})]} = 2{,}2 \cdot 10^{-4},$$

$$k_3 = \frac{C_H [C_H Q (C_H + k_1) - k_1 C_H + k_1 k_2 (Q - 2)]}{k_1 \cdot k_2 (3 - Q)} = (5 \cdot 10^{-5}),$$

$$k_4 = \frac{C_H^2 [C_H Q (C_H + k_1) - k_1 C_H + k_1 k_2 (Q - 2)] + k_1 k_2 k_3 C_H (Q - 3)}{k_1 k_2 k_3 (4 - Q)}$$

$$(7 \cdot 10^{-6}).$$

Tabelle I zeigt die Resultate der C_H-Messungen in Lösungen von Thymonucleinsäure mit und ohne Zusatz von Salzsäure oder Natronlauge. Kolumne 1 enthält die molaren Konzentrationen der Nucleinsäure, aus den gefundenen Stickstoffwerten berechnet ($C \cdot 10^3$), Kolumne 2 die gemessenen Konzentrationen der Cl-Ionen ($C_{Cl} \cdot 10^3$) und die zugesetzten Konzentrationen von NaOH ($C_1 \cdot 10^3$). Kolumne 3 zeigt die gemessenen Wasserstoffionenkonzentrationen ($C_H \cdot 10^3$) und die letzte Kolumne die aus den nebenstehenden Formeln berechneten Dissoziationskonstanten. Q bedeutet in den Formeln für k_3 und k_4 $\frac{C_1 + C_H}{C}$. Die gefundenen Konstanten können nicht die große Genauigkeit beanspruchen, die man bei den meisten schwachen Säuren und Basen erreicht hat. Dies liegt vielleicht zum Teil in einem veränderlichen kolloiden Zustand, aber vor allem darin, daß die Konstanten einander so nahe liegen. Eine bedeutende Fehlerquelle kommt auch in die Berechnungen durch die C_{Cl}-Bestimmungen, die nur auf etwa ± 5 Proz. genau waren. Bei den Berechnungen der Dissoziationskonstanten wurde die Formel für k_1 so lange gebraucht, als konstante Werte herauskamen. Wenn ich mit dieser Formel sich systematisch ändernde Werte für k_1 erhielt, wurde die Formel für k_2 angewendet usw.

k_1 und k_2 können als beinahe richtig betrachtet werden. Das dritte Wasserstoffatom dissoziierte offenbar erst bei sehr kleiner C_H, und das vierte in der Nähe neutraler Reaktion. k_3 und k_4 konnten nur nach ihrer Größenordnung berechnet werden. Dies kann ja auch nicht erstaunen, da kleine Unrichtigkeiten in k_1 und k_2 hier großen Einfluß ausüben. Außerdem konnten die Bestimmungen von C_H in den stark verdünnten Lösungen der Nucleinsäure (k_3) nicht die erforderliche Genauigkeit erlangen. Die Bestimmung von vier Dissoziationskonstanten, die einander so nahe liegen, ist natürlich sehr schwierig durchzuführen. Kein Zweifel kann aber über die Richtigkeit der Größenordnung der vier Konstanten herrschen, und schon diese ist für das Verständnis der biologischen Bedeutung der Thymonucleinsäure von größtem Interesse. Die erste Dissoziationskonstante ist also etwa 200mal größer, die vierte etwa halb so groß wie die der Essigsäure.

Die Guanylsäure dissoziiert, wie *H. Hammarsten* (18) gefunden hat, mehr ausgeprägt stufenartig als die Thymonucleinsäure, was davon kommt, daß in der Guanylsäure ein Phosphoratom zwei Wasserstoffionen liefern kann. Zum Vergleich werden unten die Dissoziationskonstanten der beiden Säuren zusammengestellt.

	k_1	k_2	k_3	k_4 bei 20°
Thymonucleinsäure .	$4{,}3 \cdot 10^{-3}$	$2{,}2 \cdot 10^{-4}$	$(5 \cdot 10^{-5})$	$(7 \cdot 10^{-6})$
Guanylsäure	$4{,}45 \cdot 10^{-3}$	$8{,}2 \cdot 10^{-7}$	$2{,}0 \cdot 10^{-10}$	—

Man kann aus diesem Vergleich schließen, daß kein Phosphoratom in der Thymonucleinsäure mehr als ein dissoziierbares Wasserstoffatom binden kann, weil man sonst eine weit größere Differenz in den Dissoziationskonstanten hätte finden müssen.

Die primären, sekundären, tertiären und quartären Dissoziationsgrade der Thymonucleinsäure wurden für verschiedene Wasserstoffionenkonzentrationen nach folgenden Formeln berechnet. Die Dissoziationsgrade wurden dabei als die Verhältnisse zwischen den Konzentrationen bzw. der ein-, zwei-, drei- und vierwertigen Anionen zur totalen Konzentration der Säureradikale nach *Michaelis* (3) definiert.

Ist die Konzentration der undissoziierten Säure gleich A und die Konzentration der Anionen bzw. A', A'', A''', A'''', so werden

$$\frac{1}{\alpha_1} = \frac{A}{A'} + 1 + \frac{A''}{A'} + \frac{A'''}{A'} + \frac{A''''}{A'},$$

$$\frac{1}{\alpha_2} = \frac{A}{A''} + \frac{A'}{A''} + 1 + \frac{A'''}{A''} + \frac{A''''}{A''},$$

$$\frac{1}{\alpha_3} = \frac{A}{A'''} + \frac{A'}{A'''} + \frac{A''}{A'''} + 1 + \frac{A''''}{A'''},$$

$$\frac{1}{\alpha_4} = \frac{A}{A''''} + \frac{A'}{A''''} + \frac{A''}{A''''} + \frac{A'''}{A''''} + 1,$$

$$\frac{1}{\varrho} = 1 + \frac{A'}{A} + \frac{A''}{A} + \frac{A'''}{A} + \frac{A''''}{A},$$

$$\alpha_\Sigma = 1 - \varrho$$

und da

$$\frac{H \cdot A'}{A} = k_1$$

$$\frac{H \cdot A''}{A'} = k_2$$

$$\frac{H \cdot A'''}{A''} = k_3$$

$$\frac{H \cdot A''''}{A'''} = k_4$$

so werden

$$\alpha_1 = \frac{1}{\frac{H}{k_1} + \frac{k_2}{H} + \frac{k_2 k_3}{H^2} + \frac{k_2 k_3 k_4}{H^3} + 1}, \quad (1)$$

$$\alpha_2 = \frac{1}{\frac{H}{k_2} + \frac{k_3}{H} + \frac{k_3 k_4}{H^2} + \frac{H^2}{k_1 k_2} + 1}, \quad (2)$$

$$\alpha_3 = \frac{1}{\frac{H}{k_3} + \frac{k_4}{H} + \frac{H^2}{k_2 k_3} + \frac{H^3}{k_1 k_2 k_3} + 1}. \quad (3)$$

$$\alpha_4 = \frac{1}{\frac{H}{k_4} + \frac{H^2}{k_3 k_4} + \frac{H^3}{k_2 k_3 k_4} + \frac{H^4}{k_1 k_2 k_3 k_4} + 1}. \quad (4)$$

$$\alpha_\Sigma = \frac{\frac{k_1}{H} + \frac{k_1 k_2}{H^2} + \frac{k_1 k_2 k_3}{H^3} + \frac{k_1 k_2 k_3 k_4}{H^4}}{\frac{k_1}{H} + \frac{k_1 k_2}{H^2} + \frac{k_1 k_2 k_3}{H^3} + \frac{k_1 k_2 k_3 k_4}{H^4} + 1}. \quad (5)$$

α_{Σ} = Dissoziationsgrad der vierbasischen Säure.
α_1, α_2, α_3, α_4 = Dissoziationsgrade der verschiedenen Dissoziationsstufen.
ϱ = Dissoziationsrest.
H = Wasserstoffionenkonzentration.

In Abb. 2 sind die Dissoziationsgrade als Funktionen von p_H in üblicher Weise graphisch dargestellt.

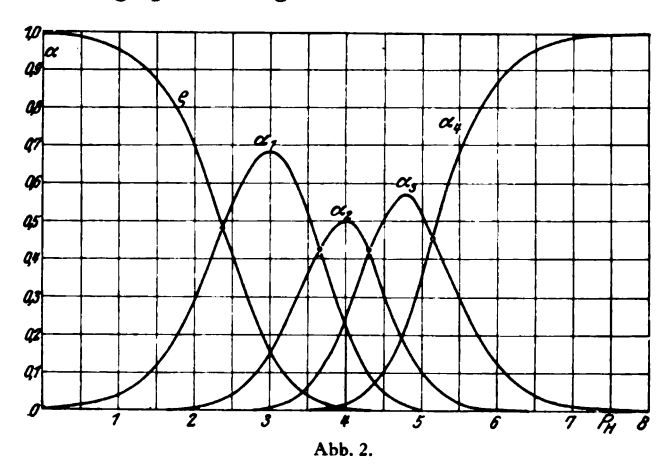


Abb. 2.

In Abb. 3 sind die gemessenen Wasserstoffionenkonzentrationen (Abszisse) bei verschiedenen molaren Konzentrationen der Nucleinsäure (Ordinate) aufgezeichnet. Aus dieser Kurve sind die eingeklammerten C_H-Werte in der Kolumne 4, Tabelle II, durch graphische Interpolation erhalten. Die nicht eingeklammerten C_H-Werte in dieser Tabelle sind direkt gemessen.

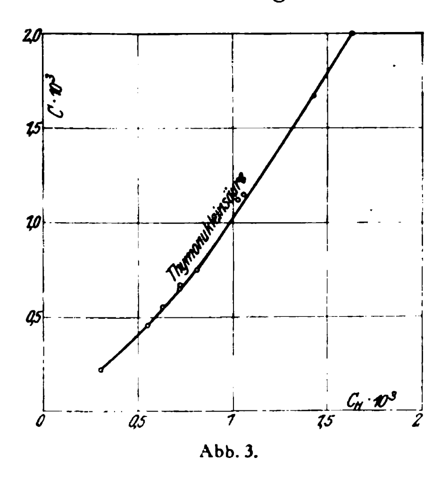


Abb. 3.

In Tabelle II sind die Leitfähigkeitswerte der Nucleinsäure angegeben. Hier ist ein Versuch gemacht, aus der Leitfähigkeit und aus den mit Hilfe der Dissoziationskonstanten berechneten ersten und zweiten Dissoziationsgraden die Wanderungsgeschwindigkeit des einwertigen Anions zu finden. Abb. 2 zeigt, daß zwischen p_H 2 und 3 nur ein- und zweiwertige Säureanionen vorhanden waren. Das molare Leitvermögen μ in diesem Gebiete (Tabelle II, Kolumne 3) ist also

Tabelle II.

Das Leitvermögen der freien Thymonucleinsäure.

Molare Konzentration . 10^3	Spez. elektr. Leitvermögen . 10^4 K	Molares Leitvermögen μ	$C_H . 10^3$	$\alpha_1 + \alpha_2$	$2\,\alpha_2$	U_{T_1}
2,23	5,774	259	1,81	0,725	0,156	35
2,01	5,171	257	1,63	0,746	0,178	24
1,67	4,469	268	1,43	0,773	0,206	25
1,53	4,181	273	(1,33)	0,786	0,222	26
1,41	3,921	278	(1,26)	0,796	0,236	27
1,22	3,434	281	(1,13)	0,814	0,266	24
1,12	3,196	285	1,03	0,828	0,290	23
1,10	3,111	283	(1,00)	0,833	0,300	18
0,92	2,667	290				$U_{T_1} = 25$ $\pm 4{,}0$
0,80	2,368	296				
0,78	2,285	293				
0,61	1,876	307				
0,56	1,700	304				
0,49	1,573	321				
0,33	1,101	334				

durch $\alpha_1(U_H + U_{T_1}) + \alpha_2(U_H + 2\,U_{T_1})$ ausgedrückt, wo U_H die relative Wanderungsgeschwindigkeit des H-Ions, U_{T_1} dieselbe des einwertigen Säureanions bedeuten. Hier wurde also vorausgesetzt, daß das zweiwertige Säureanion die doppelte Geschwindigkeit des einwertigen hatte, was bei der äußerst geringen Hydratation sicher richtig ist. Außerdem hat dies keine größere Bedeutung für den Wert von U_{T_1}. In Kolumne 7, Tabelle II, sind die Werte für U_{T_1} angegeben, die aus der Formel $\frac{\mu - U_H(\alpha_1 + \alpha_2)}{\alpha_1 + 2\,\alpha_2}$ berechnet wurden. Die mittlere Abweichung für jeden Wert war $\pm 4{,}0$.

Eine Wanderungsgeschwindigkeit des Anions von 20 bis 30 ist im Vergleich mit anderen großen organischen Ionen durchaus plausibel. Zu diesen Werten kommt man auch, wenn nach *W. Ostwald* (19) die Zahl der Atome als Abszisse und die relativen Wanderungsgeschwindigkeiten der Anionen in den von ihm untersuchten Säuren als Ordinate benutzt wird. Wenn die fast asymptotisch zur Abszisse verlaufende Kurve ausgezogen wird, schneidet sie die Ordinate bei 20 bis 30 bei einem Abszissenwert von 171 (Atomzahl der Thymonucleinsäure). Nimmt man eine Geschwindigkeit von dieser Größenordnung von vornherein an, so würde man also aus der Leitfähigkeit ($\mu_\infty = 343$) nahezu dieselben Dissoziationsgrade erhalten wie aus den potentiometrischen Messungen von C_H. Unzweifelhaft zeigen die Bestimmungen der elektrischen Leitfähigkeit und der Wasserstoffionenkonzentration (Tabelle II), daß die Schlußfolgerung berechtigt ist, daß die Ionenkonzentrationen durch diese beiden Methoden ohne größere Verschieden-

heiten quantitativ bestimmt werden können. Leider konnte U_{T_1} beim neutralen Natriumsalz der Nucleinsäure wegen der hohen inneren Reibung nicht gemessen werden. Die Frage hat besonderes Interesse im Zusammenhang mit den Resultaten der Messungen des osmotischen Druckes der Thymonucleinsäure und einiger anderen hochmolaren Elektrolyte (S. 404).

Das Leitvermögen von Na_4-T. ist so stark von der ungeheuren inneren Reibung der Wasserlösungen (S. 440) beeinflußt, daß es unmöglich war, den Dissoziationsgrad zu bestimmen.

Die K-Werte (Kolumne 3, Tabelle III) sind für die Leitfähigkeit des Kochsalzes in dem Na_4-T. ($2 \cdot 10^{-5}$ auf $40 \cdot 10^{-3}$ Äquivalente des Na_4-T.) und für die des Lösungswassers ($2{,}9 \cdot 10^{-6}$) korrigiert. Gleichzeitig ist diese Korrektion mit 3 Proz. vermindert, was durchschnittlich der Hemmung durch die innere Reibung des Na_4-T. entsprach. Die ungefähre Zahl 3 Proz. wurde aus Leitfähigkeitsbestimmungen an kochsalzhaltigen Lösungen von Na_4-T. erhalten (Tabelle XIX, S. 421). Die Hydrolyse des Na_4-T. bei größeren Verdünnungen war so unbedeutend, daß sie bei den Berechnungen außer acht gelassen werden konnte. Es war zwar sehr schwierig, die Wasserstoffionenkonzentration in den Lösungen des Na_4-T. zu bestimmen, weil die Potentiale träge waren und die kürzeste Berührung mit der Luft große Änderungen gab. Immerhin zeigen folgende Werte zur Genüge, wie unbedeutend die Hydrolyse bei Verdünnung und sogar bei Dialyse war. (Tab. IV.)

Tabelle III.

Leitvermögen des Natriumsalzes der Thymonucleinsäure.

Äquivalente Konzentration . 10^3	Verdünnung $L/1$ Äquiv.	Spez. Leitvermögen $K_{korr.}$	Äquivalentes Leitvermögen
37,4	27	8,885	24,0
24,4	41	6,240	25,6
17,6	57	4,518	25,8
16,7	60	4,292	25,8
8,1	123	2,202	27,1
6,6	152	1,779	27,0
4,4	227	1,218	27,6
3,5	286	1,000	28,6
2,9	345	0,855	29,5
2,6	385	0,770	29,6
2,1	476	0,635	30,2
2,0	500	0,621	31,1
1,8	556	0,574	31,9
1,7	588	0,504	29,6
1,3	769	0,487	37,5
0,88	1136	0,353	40,1
0,86	1162	0,350	40,7
0,48	2083	0,240	50,0
0,27	3704	0,173	64,0

Tabelle IV.

Molare Konzentration von Na_4·T.	p_H nicht dialysiert	p_H dialysiert in drei Tagen	Innenflüssigkeit / Außenflüssigkeit
4,4 . 10^{-3}	6,59	6,39	
1,7 . 10^{-3}	6,65	6,40	= 1/10
0,44 . 10^{-3}	6,67	6,32	
0,11 . 10^{-3}	6,67	6,25	

Die Messungen der Leitfähigkeit (Tabelle III) wurden 5 Stunden nach der Bereitung der Lösungen gemacht. In diesen 5 Stunden wurden die Lösungen geschüttelt. Die Lösungen wurden die ganze Zeit vor der Kohlensäure der Luft geschützt. In Abb. 4 sind die Werte der äquivalenten Leitfähigkeit (Kolumne 4, Tabelle III) an der Ordinate, die Verdünnung (Kolumne 2, Tabelle III) an der Abszisse abgesetzt.

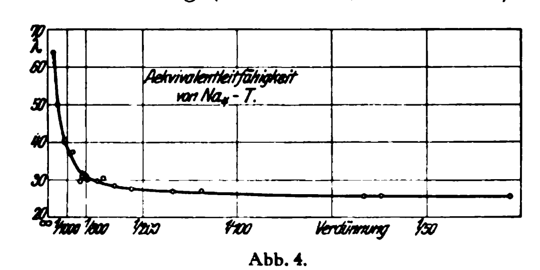


Abb. 4.

Aus der Form der Kurve ist die relativ größere Hemmung des Leitvermögens durch die innere Reibung in konzentrierteren Lösungen zu sehen. Eine Extrapolation zu unendlicher Verdünnung hat unter diesen Umständen keinen Zweck. Ich habe deshalb versucht, durch Korrektion der Viskositätssenkung mit steigender Verdünnung wenigstens den letzten Teil der Leitfähigkeitskurve zur Bestimmung des Dissoziationsgrades verwendbar zu machen. Zu diesem Zwecke wurden die schleimigen Bestandteile von Tuber Salep in der Hitze mit Wasser extrahiert und der Extrakt in 8 Wochen unter Druck dialysiert (bei 20° unter Toluolzusatz). Die innere Reibung und das Leitvermögen des Salepschleimes wurden bei verschiedenen Verdünnungen bestimmt und eine Lösung von der relativen inneren Reibung 16,8 mit verschiedenen Mengen einer Lösung von Na_4-T. mit derselben Viskosität versetzt.

Tabelle V. Leitvermögen des Natriumsalzes der Thymonucleinsäure nach Korrektion der relativen Reibung mit Salepschleim.

Äquiv. Konzentration . 10^3	Verdünnung L./1 Äquiv. V	Spez. Leitvermögen . 10^4 $\kappa_{korr.}$	Äquiv. Leitvermögen λ	Dissoziationsgrad α	Relative Reibung η	
8,1	123	2,202	27,1	0,84	16,8	(ohne Salepschleim)
4,7	212	1,321	28,0	0,87	17,3	(mit „)
1,89	529	0,567	30,0	0,93	16,4	„ „
0,94	1059	0,293	31,0	0,97	17,2	„ „

λ_∞ extrapoliert = 32,2.

Spezifisches Leitvermögen des Salepschleimes (bei einer relativen Reibung = 25,8) = 1,01 . 10^{-5}.

In Tabelle V, Kolumne 3 sind die Werte der gefundenen spezifischen Leitfähigkeit angegeben, korrigiert für die Leitfähigkeit von Salepschleim, Kochsalz und Wasser. In Kolumne 6 stehen die gefundenen Viskositätswerte der Lösungen. Die Abweichungen vom Mittelwert 16,9 bewegen sich um 1 bis 2 Proz. und dürften wohl keine größere Bedeutung haben.

Die Kurve Abb. 5 gab mittels graphischer Extrapolation für λ_∞ den Wert 32,2, woraus die Dissoziationsgrade Kolumne 5, Tabelle V, berechnet sind. Diese α-Werte sind aber sehr zweifelhaft, denn ich habe keinen Beweis dafür, daß das Leitvermögen in derselben Weise durch die hydratisierten Bestandteile des Salepschleimes beeinflußt wird wie durch die Hydratation des Na_4-T. Wenn das neutrale Natriumsalz der Thymonucleinsäure (Na_4-T.) nicht so stark hydratisiert wäre, könnte man ohne weiteres annehmen, daß es völlig so weitgehend dissoziierte wie andere Natriumsalze. Es scheint aber nicht undenkbar zu sein, daß die gewaltige Hydratation nicht nur die Leitfähigkeit, sondern auch andere, durch Ionenkonzentrationen bedingte Erscheinungen beeinflussen könnte. Hierfür sprachen entschieden die Resultate der Versuche Abteilung V über den Donnaneffekt. Hier konnte nämlich gezeigt werden, daß bei Dialyse von Na_4-T. in kochsalzhaltiger Lösung die Ionenverteilung diejenige war, die für einen Dissoziationsgrad des Na_4-T. $= 1/4$ sich nach *Donnans* Gesetz berechnen ließ. *Der Wirkungsgrad* der Natriumionen entsprach in diesem Falle also nur einem Viertel von dem bei vollständiger Dissoziation möglichen. Dies schließt wohl nicht aus, daß der wirkliche Dissoziationsgrad ein vollständiger hat sein können.

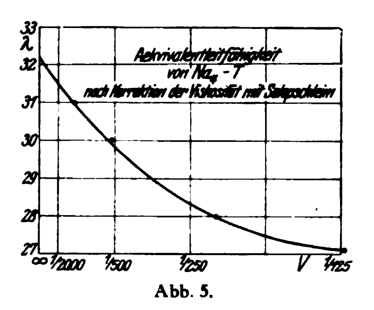


Abb. 5.

Schlußfolgerungen.

1. Frisch dargestellt, löst sich die freie Thymonucleinsäure zu einer milchigen, sauren Flüssigkeit von etwa $3 \cdot 10^{-3}$ Molarität. Ein Teil der Säure befindet sich in dieser Lösung als suspendierte Partikeln, die wahrscheinlich aus undissoziierten Molekülen bestehen, da ihre Menge durch Salzsäure vermehrt wird. Die scheinbaren Dissoziationskonstanten unterscheiden sich voneinander nur durch etwa eine Zehntelpotenz und zeigen, daß die Thymonucleinsäure eine unerwartet starke Polyphosphorsäure ist, in welcher jedes Phosphoratom nur ein dissoziierbares Wasserstoffatom bindet. Die Berechnungen der Dissoziation aus der potentiometrisch gemessenen Wasserstoffionenkonzentration und aus dem Leitvermögen geben gute Übereinstimmung, wenn die

Wanderungsgeschwindigkeit des einwertigen Anions gleich 25 gesetzt wird, eine ungefähre Zahl, die aus *W. Ostwalds* Bestimmungen über den Zusammenhang zwischen Wanderungsgeschwindigkeit und Atomzahl bei organischen Säuren hervorgeht.

2. Der Dissoziationszustand von Na_4-T. konnte nicht durch Leitfähigkeitsmessungen definiert werden. Aus der Ionenverteilung bei Dialyse in kochsalzhaltiger Lösung geht aber hervor, daß das vierwertige Natriumsalz der Thymonucleinsäure einen wenigstens *scheinbaren* Dissoziationsgrad von etwa 0,25 in verdünnten Lösungen hatte.

Abteilung IV.

Der osmotische Druck von Thymonucleinsäure und ihren Verbindungen.

Sowohl die Nucleinsäure als ihr Natriumsalz sind Elektrolyte und sollten also je nach dem Dissoziationsgrade größere osmotische Drucke zeigen, als die für nur die molaren Konzentrationen im undissoziierten Zustande berechneten. Es hat sich aber gezeigt, daß der osmotische Druck dieser Elektrolyte, gleichgültig ob manometrisch oder indirekt gemessen, sogar etwas kleiner ist als der für den undissoziierten Zustand berechnete. Der osmotische Druck der freien Nucleinsäure wurde z. B. *kleiner gefunden als der für nur die gemessenen H-Ionen berechnete Druck.*

Der hohe osmotische Druck von Elektrolyten ist durch *Arrhenius'* Dissoziationstheorie erklärt worden, und der Dissoziationsgrad kann nach ihm in quantitativ derselben Weise aus osmotischen und elektrischen Ionenmessungen berechnet werden. Das Verhältnis i_{osm}/i_L zwischen *de Vries-van 't Hoffs* Faktor i aus osmotischen Messungen ($i_{osm.}$) und aus Leitfähigkeitsbestimmungen (i_L) berechnet, wurde gleich 1 für verdünnte Lösungen gefunden (28).

Biltz und *Vegesack* (20), *Bayliss* (21), *Donnan* und *Harris* (8b) haben früher für Kongorot einen abnormen Druck gefunden, der 90 bis 97 Proz. von dem für den undissoziierten Zustand berechneten war. Die genannten Autoren suchen das Phänomen als eine Aggregation, die gerade die Dissoziation aufhebt, zu erklären. Diese höchst unwahrscheinliche Hypothese wird auch von *Höber* (22) aufgenommen. Daß sie unrichtig ist, wird dadurch gezeigt, daß bei mehreren Elektrolyten, wo die Ionen elektrometrisch gemessen wurden, die gemessenen Drucke *kleiner* waren als der für nur die eine Ionengattung berechnete Druck (23). *Donnan* scheint sich mehr der Meinung zuzuwenden, daß die Non-Diffusibilität der großen Anionen im Kongorot eine solche Wirkung auf den osmotischen Druck der von ihnen elektrostatisch festgehaltenen Natriumionen ausübt, daß diese osmotisch unwirksam werden. Diese Erklärungsweise des abnormen Druckes als einen Membraneffekt

irgend einer unbekannten Art ist indessen hinfällig, denn sowohl Kongorot wie Nucleinsäureverbindungen und einige andere hochmolekularen Elektrolyte geben, wie *E.* und *H. Hammarsten* (23) gezeigt haben, denselben osmotischen Druck sowohl direkt manometrisch als indirekt durch Gefrierpunktsbestimmung gemessen. Dies war ja auch nach der Theorie für den osmotischen Druck zu erwarten.

Die Membran hat also nichts mit der Abnormität des Druckes zu tun und eine Aggregation kann auch nicht allein das Phänomen erklären.

Der Gedanke lag nun nahe, daß der Grund zu dem abnorm niedrigen Drucke der erwähnten hochmolaren Elektrolyten in dem Maße oder Volumen der Moleküle lag.

Indessen haben *Sobolew* (24), *Rosenheim* und *Kohn* (25) und *Copaux* (26) bei Messungen der Gefrierpunktsdepression der Metawolframsäure in Wasserlösung gezeigt, daß dieser Elektrolyt trotz der großen Masse des Anions (924) einen *van 't Hoff*-Faktor i gibt, der bei größeren Verdünnungen sehr bedeutende Dissoziation anzeigt. Die Leitfähigkeit scheint niedrigere Dissoziation anzugeben als der osmotische Druck (Tab. VI; 26).

Tabelle VI.

Gefrierpunkte und Leitvermögen von Metawolframsäure.
Nach *Sobolew*, *Rosenheim* und *Kohn*, und *Copaux*.

g $H_2W_4O_{13}$ / 100 g Wasser	Δ	*van 't Hoffs* Faktor i	g $H_2W_4O_{13}$ / 100 g Wasser	Δ	*van 't Hoffs* Faktor i
0,3489	0,018	2,53	10,2	0,36	1,80
0,6992	0,034	2,32	12,58	0,465	1,80
1,410	0,062	2,15	16,16	0,615	1,75
2,872	0,117	1,99	20,4	0,65	1,63
5,1	0,19	1,90	25,94	0,879	1,[illegible]6
5,915	0,228	1,89	30,6	0,96	1,60
8,563	0,321	1,92			

V	32	64	128	256	512	1024	L./$H_2W_4O_{13}$
μ_{25^0} =	170,4	233,5	279,1	325,2	371,6	416,7	Rec. Ohm.

Wie Tabelle VI zeigt, konnte *Sobolew* für eine z. B. 0,3489proz. Lösung der freien Säure einen *van 't Hoff*-Faktor $i = 2,53$ aus dem Gefrierpunkt berechnen, was sehr starke Dissoziation der zweibasischen Säure bedeutet ($\alpha = 0,765$).

Der abnorme osmotische Druck der erwähnten hochmolaren Elektrolyten kann aus dem Massenverhältnis zwischen den Ionen wahrscheinlich keine unmittelbare Erklärung finden, und es scheint dann nicht undenkbar zu sein, daß diese im Volumverhältnis zwischen den Ionen liegen konnte.

Als Arbeitshypothese könnte man das Postulat aufstellen, daß zwei Ionen in Salzbildung den doppelten osmotischen Druck der un-

dissoziierten Verbindung geben, nur unter der Voraussetzung, daß ihr kleinster Abstand voneinander nie unter eine gewisse Größe abfällt.

Es leuchtet ein, daß diese Forderung für Verbindungen zwischen kleinen und voluminösen Ionen nicht erfüllt zu sein braucht. Um diese Aussage zu verdeutlichen, ist folgendes Schema (23) (Abb. 6) aufgezeichnet, wo das große Ion mit J, das kleinere mit i bezeichnet ist, b sei der kleinste Abstand von J, bei dem die Ionen noch als zwei getrennte Massen osmotisch wirken können, und a der mittlere Abstand der Ionen bei ihren Bewegungen gegeneinander. Im Schema sind diese

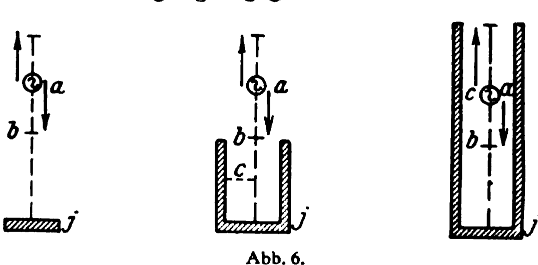


Abb. 6.

Bewegungen durch die Pfeile angegeben und der Einfachheit wegen als Oszillationen des kleinen Ions gedacht. Es seien $a > b > c$. Im Abstand C würde das kleine Ion keine selbständige osmotische Massenwirkung mehr besitzen und *in dieser Hinsicht* keine anderen Eigenschaften haben als die Atomkomplexe des großen Ions, die ja auch keine selbständige Massenwirkung haben. Das kleine Ion ist im Planetensystem des großen verborgen.

Wenn also (I, Abb. 6) das kleine Ion bei seiner Bewegung dem größeren nie näher als bis zum Abstand b kommt, würden beide Ionen den gleichen osmotischen Druck haben. Ein solcher Elektrolyt würde sich in osmotischer Hinsicht nach *van 't Hoff-Arrhenius* normal verhalten.

Im Falle II würde sich immer ein Teil der kleinen Ionen in gleichem oder längerem, der andere Teil in kürzerem Abstand von dem großen Ion als der Abstand b befinden. Ein gewisses Prozent der kleinen Ionen müßte somit osmotisch unwirksam sein. Im Falle III würde das kleine Ion nie den Abstand b von dem größeren erreichen können, sondern müßte sich immer in einem kleineren Abstand bewegen, und der osmotische Druck müßte dann gleich dem für den undissoziierten Zustand werden. Mit dieser scheinbaren Erklärungsweise wird also vorausgesetzt, daß nicht nur das Volumen des größeren Ions, sondern möglicherweise auch seine Form ausschlaggebend sein könnte.

Diese Diskussion ist natürlich nur gemacht, um hervorzuheben, daß man sich prinzipiell einen solchen Volumeffekt denken kann. Es hat sich nun gezeigt, daß solche Übergänge, wie der Fall II, Abb. 6, erfordert, wirklich vorkommen, indem *H. Hammarsten* (18) in diesem

Laboratorium gezeigt hat, daß, während das Natriumsalz der Guanylsäure (Molekulargewicht 363) den für den Dissoziationsgrad berechneten osmotischen Druck hat, die Glykochol- und Taurocholsäuren (Molekulargewicht bzw. 465 und 515) und deren Natriumsalze mit steigenden Molekülvolumina steigende Abweichungen von den nach den Dissoziationsgraden berechneten osmotischen Drucken geben. Mit Molekülvolumina werden hier die aus den spezifischen Gewichten von Lösungen mit bekannter Konzentration für die Molekulargewichte berechneten Volumina in Kubikzentimetern verstanden.

Um eine definitionsmäßige Größe der Abweichung zu geben, sind in einigen der folgenden Tabellen die Differenzen zwischen den aus den Dissoziationsgraden berechneten und den gefundenen Drucken in Prozenten von den berechneten mit A bezeichnet. Der prozentuale Anteil der kleineren Ionen, die „verborgen" wären, wird dann, wie eine einfache Rechnung zeigen will, durch den Ausdruck $A \cdot \frac{1 + n\alpha}{n\alpha} = F$ gegeben, wo α den Bruchteil des Moleküls, der dissoziiert ist, und n die Wertigkeit des Elektrolyts bedeutet.

Ist das Volumverhältnis der beiden Ionen in der angegebenen Richtung für die Größe des osmotischen Druckes bestimmend, so könnte man eine Änderung erwarten, wenn die kleinen Ionen wie Na, H, Cl durch größere vertauscht würden. Da die Natriumsalze von Thymonucleinsäure und Kongoblau osmotische Drucke zeigen, die ungefähr mit denen für die undissoziierten Zustände berechneten gleich sind, so würden die Verbindungen dieser Säuren mit Ionen, die größer als Natriumionen sind, höhere osmotische Drucke haben als die, welche sich für die undissoziierten Verbindungen berechnen lassen.

Es hat sich auch gezeigt, daß die Salze der genannten Säuren mit Trimethyl-, Triäthyl-, Tripropylamin und Tetramethylammoniumhydrat mit steigendem Volumen der Aminionen steigende osmotische Drucke geben. Diese Resultate stehen ja in bestem Einklange mit dem hier aufgestellten allgemeinen Satze, daß für Elektrolyte die osmotische Druckwirkung mit dem Volumverhältnis zwischen Kat- und Anionen variiert. Es begegnet doch Schwierigkeiten, die kontinuierliche Zunahme des osmotischen Druckes mit der Volumvergrößerung der einen Ionengattung im Schema Abb. 6 einzufügen. Nach der hier angelegten Betrachtungsweise würde man eher bei einem gewissen Volumen der großen Ionen eine kritische Steigerung des Druckes bis zum normalen Werte erwarten, denn entweder können die kleineren Ionen dank ihrem kleinen Volumen in das Atomsystem der großen einwandern, verborgen werden, oder sie können dies dank ihrer relativen Größe nicht. Im letzteren Falle würde man den nach dem Dissoziationsgrade berechneten Druck erhalten. Im Gegenteil steigt aber der Druck, wie

gesagt, kontinuierlich. Man könnte ja als Hilfshypothese Deformationen der mäßig großen Aminionen annehmen und in der Weise die kontinuierliche Steigerung des Druckes zu erklären versuchen. Die Aminionen sollten dann mit steigendem Volumen immer schwerer deformierbar und also schwerer an das große Ion assimilierbar werden.

Will man annehmen, wie in Abb. 6 getan ist, daß die kleineren Ionen in Lücken in dem Atomsystem des größeren Ions herein und hinaus schlüpfen können, so müßte die Form des größeren Ions und die Weite der hypothetischen Lücken für die osmotische Wirkung der Sonen von Bedeutung sein. Wenn z. B. die Weite dieser Lücken in Iwei Substanzen verschieden groß wäre, könnte man erwarten, daß zie eine ein Aminion leichter als die andere assimilieren würde. Während dun die Salze der Thymonucleinsäure mit Tetramethylammoniumnydrat und mit Triäthylamin einen Druck von ungefähr 160 Proz. hon dem für den undissoziierten Zustand berechneten gaben und das valz von Kongoblau mit Triäthylamin ungefähr 190 Proz., so gab das Salz der Taurocholsäure mit Tetramethylammoniumhydrat, wie *H. Hammarsten* fand, fast denselben Wert wie das Natriumsalz, und erst das Salz dieser Säure mit einem so großen Molekül wie Isotriamylamin zeigte eine Steigerung im osmotischen Drucke gegenüber dem Natriumsalze. Solche Hypothesen sind nun von zweifelhaftem Werte, und ich kann aus den unten näher angegebenen Resultaten *nur den ganz allgemeinen Schluß ziehen, daß der osmotische Druck der Elektrolyte bei sehr großem Verhältnis zwischen den Volumina der Ionen derselbe ist wie für Nichtelektrolyte, und daß der Druck bei Verminderung des genannten Verhältnisses sich mehr und mehr den nach Arrhenius und van 't Hoff geforderten nähern.*

Die Resultate der osmotischen Messungen an der Thymonucleinsäure sind in der Tabelle VII zusammengestellt.

Tabelle VII. Osmotischer Druck der Thymonucleinsäure. Molekulargewicht berechnet = 1457. Molekularvolumen gefunden: 837 (unsicher).

Molare Konzentration . 10^3 in Gleichgewicht C		Wasserstoffionenkonzentration . 10^3 in Gleichgew. c_H innen	Osmotischer Druck in cm Wasser		P_i/P_I	Berechnet für $C.0,70 + c_H$
innen	außen		berechnet für die Konz. = C P_I	gefunden P_i		P_{II}
1,67	0,002	1,43	41,4	27,9	0,67	64,3
1,20	0,000	1,08	29,7	21,3	0,72	47,5
1,00	0,001	0,92	24,8	17,5	0,70	40,1
				Mittel:	0,70	

Die osmotischen Messungen (Tabellen VII und VIII) wurden in zweimal 12 Stunden zu Ende geführt. Eine erste Bestimmung wurde

12 Stunden nach dem Beginn der Versuche und eine zweite nach weiteren 12 Stunden gemacht. Die Drucke waren immer innerhalb 1 cm Wasser konstant. Die angegebenen Werte sind die Durchschnittswerte aus zwei Bestimmungen.

Der gefundene osmotische Druck war in allen Bestimmungen außerhalb der Fehlergrenzen niedriger als der nur für die Wasserstoffionenkonzentrationen berechnete. Für die Werte von C_H in Tabelle VII, Kolumne 3, berechnen sich nämlich die Drucke 35,4, 26,8 und 22,8 cm Wasserdruck, welche alle außerhalb der Fehlergrenzen höher sind als die P_i-Werte, Kolumne 5. Es ist also, wie vorher erwähnt, nicht möglich, die niedrigen Drucke ausschließlich mit Aggregation zu erklären. Elektrometrische C_{Cl}-Messungen der Innen- und Außenflüssigkeiten im Gleichgewicht gaben wandernde Potentiale von derselben Höhe wie gutes destilliertes Wasser. Eine Senkung der Drucke durch Elektrolyte (HCl, NaCl) war also ausgeschlossen. Die Zahlen Kolumne 6 zeigen, daß die gefundenen Drucke P_i um 30 Proz. niedriger waren als die für den undissoziierten Zustand berechneten. Wenn statt C die korrigierten Werte $0{,}70 \cdot C$ zur Berechnung der Drucke angewendet werden, resultieren die Druckwerte P_{II}, Kolumne 7. F muß nach dieser Korrektion selbstverständlich gleich 100 werden, d. h. nach der S. 402 angelegten Betrachtungsweise würden alle Wasserstoffionen osmotisch unwirksam gewesen sein. Die Korrektion für Aggregation ist ja gar nicht einwandsfrei, wenn sie auch berechtigt zu sein scheint.

Tabelle VIII. Osmotischer Druck des Natriumsalzes der Thymonucleinsäure. Molekulargewicht berechnet: 1545. Molekularvolumen gefunden: 817.

Molare Konzentration . 10^3 in Gleichgewicht C		Osmotischer Druck in cm Wasser			
innen	außen	berechnet für die osm. Konz. = C P_I	gefunden P_i	P_i/P_I	berechnet für $C \cdot 0{,}78\,(1+4.1)$ P_{II}
0,33	0,003	8,1	6,5	0,80	31,6
0,63	0,006	15,6	13,0	0,83	60,8
1,28	0,005	31,7	25,0	0,79	123,6
1,58	0,004	39,2	31,0	0,79	152,9
2,42	0,004	59,9	47,7	0,79	233,6
3,57	0,005	88,5	69,0	0,78	344,5
4,28	0,005	106,1	82,5	0,78	412,9
4,30	0,009	106,6	83,1	0,78	414,9
4,38	0,007	108,5	83,5	0,77	422,6
4,10	0,010	101,4	82,0	0,81	395,6
4,52	0,005	111,8	85,6	0,77	436,8
4,50	0,005	111,3	85,8	0,77	434,1
4,50	0,005	111,3	86,5	0,78	434,1
9,0	0,009	222,7	173,2	0,78	868,4
			Mittel:	0,78	

Da die Bestimmung von α wegen der gewaltigen inneren Reibung unsicher ist, habe ich die Werte von A und F in der Tabelle VIII nicht angegeben. Es geht aus den Werten Kolumne 5, Tabelle VIII, hervor, daß der osmotische Druck um 22 Proz. niedriger war als der für den undissoziierten Zustand berechnete. Wie dies bei der freien Säure getan wurde, könnten vielleicht diese 22 Proz. einer Aggregation zugeschrieben werden. Bei einer starken Dissoziation von Na_4-T. kann man mit großer Bestimmtheit voraussetzen, daß eine Aggregation nicht größer sein kann als entsprechend einer Senkung des osmotischen Druckes von etwa 20 Proz., weil nur die undissoziierten Moleküle aggregieren können.

Wird $\alpha = 1$ gesetzt, was jedenfalls nicht experimentell begründet ist, so läßt sich A zu im Mittel 79,8 berechnen und daraus F zu $\frac{5 \cdot 79{,}8}{4} = 99{,}8$. Auch wenn vollständige Dissoziation vorausgesetzt wird, würden also alle Natriumionen osmotisch unwirksam gewesen sein.

Tabelle IV zeigt, daß die niedrigen Drucke (Tabelle VIII, Kolumne 4) nicht durch Hydrolyse bedingt waren, indem die Änderungen in p_H nach Dialyse verhältnismäßig unbedeutend waren. Da weiter elektrometrische Messungen (S. 387) einen Gehalt an Cl-Ionen von 0,00013 n bei 0,0057 molarer Konzentration von Na_4-T. zeigten, und die Innenflüssigkeiten in den Osmosversuchen 11 ccm gegen ungefähr 200 ccm für die Außenflüssigkeiten betrugen, so kann daraus mit Sicherheit geschlossen werden, daß kein Donnaneffekt die Drucke im meßbaren Grade hat beeinflussen können. Die Stickstoffbestimmungen in den Außenflüssigkeiten gaben sehr kleine Werte, und die daraus berechneten molaren Konzentrationen von Na_4-T. (Tabelle VIII, Kolumne 2) wurden vernachlässigt. Zu bemerken ist, daß die berechneten Druckwerte Kolumne 6 ungefähr fünfmal so hoch sind wie die gefundenen Kolumne 4. Mit einem Dissoziationsgrad von 0,25 wird $P_{II} = 2{,}0 \cdot P_i$.

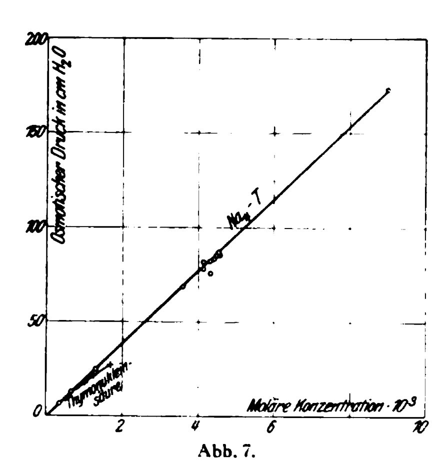


Abb. 7.

Abb. 7 zeigt die Abhängigkeit des osmotischen Druckes von der Konzentration bei der freien Thymonucleinsäure (kurze Kurve) und bei Na_4-T. (lange Kurve). Für die freie Säure zeigt die Kurve eine leichte Krümmung, was vielleicht auf stärkere Aggregation bei höheren Konzentrationen beruht. Die gesättigten Nucleinsäurelösungen zeigen nämlich im Ultramikroskop

deutlich stärkere Aggregation als die verdünnten. Für Na_4-T. gibt die Kurve volle Proportionalität an, was auch zu erwarten war, wenn die Verminderung der Natriumionen mit steigender Konzentration keine Rolle für den osmotischen Druck spielt.

Tabelle IX.

Gefrierpunkt des Natriumsalzes der Thymonucleinsäure.

Molare Konzentration . 10^3 C	Gefrierpunkt berechnet für C I	Gefrierpunkt gefunden II	II/I
15,5	— 0,029	— 0,022	0,76
7,0	— 0,013	— 0,010	0,77
3,28	— 0,0062	— 0,006	(0,97)

Die Bestimmungen der Gefrierpunkte (Tabelle IX) zeigen dasselbe Verhältnis zwischen dem gefundenen und dem für den undissoziierten Zustand berechneten Drucke wie die direkten Bestimmungen (Tabelle VIII). Der dritte Wert Kolumne 3: 0,97, ist wegen der großen Verdünnung nicht zuverläßlich. Die Resultate sind in der Hinsicht wertvoll, daß sie mit aller Deutlichkeit zeigen, daß die niedrigen Drucke (Tabelle VIII) nicht als ein Membranphänomen aufzufassen sind, und daß kein Donnaneffekt den osmotischen Druck bei den direkten Messungen beeinflußt hat. Ich habe nur diese drei Bestimmungen des Gefrierpunktes gemacht, weil *H. Hammarsten* (18) bei zahlreichen direkten und indirekten Messungen des osmotischen Druckes für mehrere Substanzen mit abnormen Drucken die völlige Übereinstimmung der Resultate mit beiden Methoden gezeigt hat. Es muß hervorgehoben werden, daß die niedrigen Drucke bei der Thymonucleinsäure und ihrem Natriumsalze wenigstens zum Teil auch dadurch erklärt werden könnten, daß die Polyvalenz des Nucleinsäureanions nach *Milner* und *Bjerrum* (S. 415) eine starke Annäherung der entgegengesetzt geladenen Ione bewirkte.

Tabelle X.

Stickstoffverteilung in dem Ammoniumsalze der Thymonucleinsäure.

Lösung Nr.	mg Total-N in 100 ccm	mg Ammoniak-N in 100 ccm I	mg Nucleinsäure-N in 100 ccm II	(I + II)	II/I
1. (Tab. XI)	112,0	23,4	89,0	112,4	3,80
2. „	99,8	20,3	77,8	98,1	3,83
3. „	54,8	10,8	41,4	52,2	3,83

Die Ammonium- und Aminsalze wurden aus mit Salzsäure neugefällter Thymonucleinsäure durch Schüttelung mit den Basen bereitet. Die Basen wurden so lange zugesetzt, bis die Reaktion der Lösungen

auf rotes Lackmuspapier derjenigen einer Phosphatmischung von beim Ammoniumsalz $p_H = 7,2$, bei den Aminsalzen $= 7,0$ gleich wurde.

In den Lösungen der Salze wurden die Basen nach Destillation aus alkalischer Lösung über in Salzsäure durch Titration mit n/28,02 Natronlauge (Methylrot-Methylenblau als Indikator) bestimmt. Der Nucleinsäurestickstoff wurde nach Verbrennung des Destillationsrestes mit Schwefelsäure nach *Kjeldahl* und der Totalstickstoff in einer zweiten Portion bestimmt. Die Fehlergröße der Basen- und Stickstoffanalysen betrug bei Bestimmungen von etwa 2 mg Stickstoff ungefähr $= \pm 1$ Proz. Die dadurch bedingte Unsicherheit in den berechneten osmotischen Druckwerten wird also innerhalb der Fehlergrenzen der Druckmessungen fallen.

Tabelle X zeigt die Resultate dieser Analyse an den Ammoniumsalzlösungen, die für die osmotischen Messungen verwendet wurden. Das berechnete Verhältnis zwischen Ammonium- und Nucleinsäurestickstoff in dem vierwertigen Salze ist = 3,75. Gefunden wurde 3,83, was einen kleinen Überschuß an Ammoniak bedeutet, der in diese Lösungen absichtlich zugesetzt worden war, um eine Hydrolyse in den Osmosversuchen zurückzudrängen.

Tabelle XI.

Osmotischer Druck des Ammoniumsalzes der Thymonucleinsäure.

Nr.	Molare Konzentration . 10^2				Totale osmotische Konzentration . 10^2 innen, wenn $\alpha = 1$	Osmot. Druck in cm Wasser			P_i/P_I
	Innen			außen Ammoniak		gefunden P_i	berechnet		
	Nucleinsäure C	Ammoniak gefunden	Ammoniak berechnet				wenn $\alpha = 1$ P_{II}	für die Konz. = C P_I	
1	0,42	1,67	1,68	0,03	2,06	127,4	510	96,5	1,32
2	0,37	1,45	1,48	0,03	1,79	110,2	443	84,3	1,31
3	0,20	0,77	0,80	0,03	0,94	56,5	233	42,2	1,34

Die osmotischen Messungen (Tabelle XI) wurden in derselben Weise, wie für die freie Thymonucleinsäure beschrieben ist, ausgeführt. Die Drucke waren innerhalb 2 cm Wasser konstant. In diesen Versuchen wurde keine Luft (wie bei *Sörensens* Methode) durch die Außenflüssigkeiten geleitet.

Das Verhältnis zwischen Ammoniak und Nucleinsäure war (Tabelle XI, Kolumnen 2, 3 und 4) im Gleichgewicht das Richtige, und es war verhältnismäßig viel Ammoniak (Kolumne 5) in die Außenflüssigkeit gegangen. Aller Stickstoff in der Außenflüssigkeit wurde hierbei als Ammoniak gerechnet. Diese Ammoniakkonzentrationen wurden bei der Berechnung von P_I und P_{II} einfach von den Konzentrationen Kolumne 6 abgezogen. Wenn diese etwas zu hohe Korrektion ganz unterlassen wird, erhält man ein Verhältnis $P_i/P_I = 1,20$. Mit

der Korrektion war (Kolumne 10) das Verhältnis $P_i/P_I = 1{,}32$ gegen 0,78 für das Natriumsalz (Tabelle VIII). Es ist ja nicht möglich, genau zu sagen, wie viel von dieser Steigerung auf eventuelle Verminderung einer Aggregation im Verhältnis zu derjenigen des Na_4-T. beruht. Da aber die Aminsalze mit steigendem Molekulargewicht der Amine steigende Drucke gaben und man wohl kaum in der homologen Reihe der Nucleinsäuresalze an eine kontinuierliche Verminderung einer Aggregation denken kann, ist wohl auch der relativ hohe Druck des Ammoniumsalzes wenigstens zum Teil auf andere Ursachen als eine Senkung des Aggregationsgrades zu beziehen. Leider war es auch nicht gut möglich, den Dissoziationsgrad des Ammoniumsalzes aus Leitfähigkeitsbestimmungen zu erhalten, weil sich bei den höheren Verdünnungen eine Hydrolyse bemerkbar machte (Tabelle XII, Kolumne 7).

Tabelle XII.

Leitvermögen, relative Reibung und p_H des Ammoniumsalzes der Thymonucleinsäure.

Nr.	Äquivalente Konzentration . 10^3	Verdünnung $L/1$ Äquivalent	Spezifisches Leitvermögen 10^4 (korr.)	Äquivalentes Leitvermögen	Relative Reibung	p_H
1	34,0	29	17,977	52	16,4	7,10
2	27,2	37	14,814	54	10,2	7,02
3	20,4	49	11,206	55	8,1	7,02
4	13,6	73	7,678	56	6,30	7,07
5	6,8	147	4,163	61	4,20	7,31
6	2,7	370	1,871	69	2,44	7,51
7	1,4	714	1,048	75	1,72	7,60
8	0,72	1388	0,663	92	—	7,82

Die Stammlösung (Nr. 1, Tabelle XII), aus der die anderen Lösungen durch Verdünnung bereitet wurden, gab bei der Analyse ein Verhältnis Ammoniak-N : Nucleinsäure-N = 3,74. Die Nucleinsäure wurde hier mit Ammoniak versetzt, bis die Lösung dieselbe Reaktion auf neutrales Lackmuspapier gab wie eine Phosphatmischung von $p_H = 6{,}9$.

Die Resultate der Messungen an den Aminverbindungen sind in Tabelle XIII zusammengestellt, Die Tetramethylammoniumhydratverbindung wurde nur auf Totalstickstoff analysiert und der Nucleinsäure- und Basenstickstoff unter Annahme eines vierwertigen Salzes berechnet. Daß die Hydrolyse dieser Verbindung bei der Dialyse nicht größer hat sein können als die des Natriumsalzes, zeigen die p_H-Werte Kolumne 8. Die berechnete Konzentration der Nucleinsäure war wohl deshalb ein wenig zu hoch. Die Differenzen zwischen dem gefundenen und dem berechneten Aminstickstoff Kolumnen 3 und 6 zeigen zu wenig Aminstickstoff im Gleichgewicht (in den Versuchen A: 13,8 und 14,8 Proz.; C: 10,4 und 11,5 Proz.; D: 3,9 und 10,7 Proz. zu wenig

Tabelle XIII. Osmotischer Druck der Salze der Thymonucleinsäure mit Trimethyl-, Triäthyl-, Tripropylamin und Tetramethyl-ammoniumhydrat.

Art der Aminkomponente	Innenflüssigkeit							Außenflüssigkeit	Osmotischer Druck in cm Wasser		
	mg Stickstoff auf 100 ccm gefunden als:				Amin-N berechnet für das 4-wertige Salz	Mol. Konzentration . 10^3 der Nucleinsäure C	p_H	mg Stickstoff gefunden auf 100 ccm	gefunden P_i	berechnet für C P_I	P_i/P_I
	Totaler N	Amin-N	Nucleinsäure-N	ΣN							
A. Trimethylamin	147,5	27,5	119,8	147,3	31,9	5,7	5,89	0,00	194,1	141,2	1,37
	58,3	11,0	48,3	59,3	12,9	2,3	5,95	0,00	75,5	57,0	1,33
B. Tetramethyl-ammoniumhydrat	117,5	—	(92,8) ber.	—	24,7	4,4	6,28	0,01	157,2	109,0	1,44
	110,0	—	(86,8) „	—	23,1	4,1	6,14	0,01	147,6	101,6	1,45
C. Triäthylamin	139,0	26,8	112,3	139,1	29,9	5,3	6,35	0,01	196,0	131,3	1,49
	80,5	15,4	65,1	80,5	17,4	3,1	6,37	0,005	114,7	76,8	1,49
D. Tripropylamin	111,3	22,60	88,3	110,9	23,5	4,2	5,91	0,01	178,6	104,1	1,71
	(31,6) ber.	6,07	25,5	—	6,8	1,2	6,13	0,00	52,5	29,7	1,77

Aminstickstoff). Wahrscheinlich liegt die Ursache der niedrigen Aminkonzentrationen in den Innenflüssigkeiten in einer Hydrolyse. In den Außenflüssigkeiten wurde doch nur sehr wenig Stickstoff gefunden (Kolumne 9), was durch eine Auslüftung der Amine bei der Durchleitung von kohlensäurefreier Luft erklärt werden kann. Die Stickstoffkonzentrationen in den Außenflüssigkeiten wurden bei den Berechnungen nicht berücksichtigt. Die p_H-Werte (Kolumne 8) lagen sehr nahe 6. Dies zeigt unzweideutig, daß kein freies abhydrolysiertes Amin im Gleichgewicht in den Innenflüssigkeiten vorhanden war, denn schon eine freie Konzentration des schwächsten der Amine, Trimethylamin, von $1 \cdot 10^{-4}$ müßte ein p_H ungefähr 11 geben. Die Dissoziationsgrade wurden nicht bestimmt, aber sie müssen wahrscheinlich von derselben Größenordnung wie die des Natriumsalzes sein. Es kann angenommen werden, daß Dissoziation und Aggregation in den verschiedenen Aminverbindungen die gleichen waren. In Kolumne 12 sind die Verhältnisse zwischen den gefundenen und den für den undissoziierten Zustand berechneten Drucken zusammengestellt. Die Differenzen in P_i/P_I zwischen den verschiedenen Salzen liegen weit außerhalb der Fehler-

grenzen und geben somit sichere Auskunft darüber, daß die Drucke mit steigenden Volumina der Aminionen höher wurden (Tabelle XIV).

Tabelle XIV.

	P_i/P_I
Die freie Thymonucleinsäure	0,70
Das 4-wertige Natriumsalz der Thymonucleinsäure	0,80
„ „ Ammoniumsalz der Thymonucleinsäure	1,32—1,20
„ „ Trimethylaminsalz der Thymonucleinsäure	1,35
„ „ Tetramethylammoniumsalz der Thymonucleinsäure	1,45
„ „ Triäthylaminsalz der Thymonucleinsäure	1,50
„ „ Tripropylaminsalz der Thymonucleinsäure	1,74

Tabelle XV zeigt die Resultate einiger gleichartigen Messungen am Kongoblausalze, die von *E. Jorpes* und *G. Hellgren* (27) ausgeführt wurden.

Tabelle XV.

	P_i/P_I aus Messungen von dem	
	osmot. Druck	Gefrierpunkt
Das 2-wertige Natriumsalz von Kongoblau	1,20	1,19
„ „ Trimethylaminsalz von Kongoblau	1,26	1,24
„ „ Triäthylaminsalz von Kongoblau	—	1,88
„ „ Tripropylaminsalz von Kongoblau	—	2,91 (sehr unsicher)

Die Molekülvolumina der drei Radikalen Trimethyl-, Triäthyl- und Tripropylamin müssen sich wie 1 : 2 : 3 verhalten. Werden diese Zahlen als Abszissen, die Werte für P_i/P als Ordinaten abgesetzt, erhält man für die drei Aminverbindungen der Thymonucleinsäure und der Kongosäure die Kurven Abb. 8.

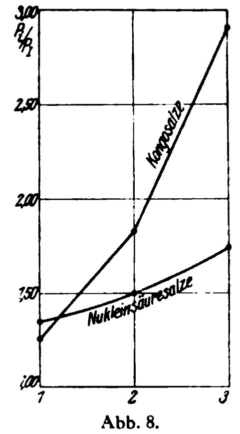


Abb. 8.

Wie früher schon hervorgehoben wurde, könnte man sich denken, daß nicht nur das Volumen der Ionen, sondern auch ihre Form für den osmotischen Druck von Bedeutung sei, indem man sich vorstellen kann, daß die Zwischenräume im größeren Ion, durch welche die kleineren herein- und hinausschlüpften, in verschiedenen Stoffen verschieden weit sein könnten. Abb. 8 zeigt, daß die Aminionen in Salzbindung mit Kongo- und mit Nucleinsäure eine ungleich starke Wirkung auf den osmotischen Druck hatten.

In Tabelle XVI sind einige Resultate von *W. Biltz* (20c) von Messungen des Leitvermögens und des osmotischen Druckes einiger Farbstoffe in bezug auf *A* und *F* umgerechnet worden.

Tabelle XVI.

Osmotischer Druck der Natriumsalze einiger Farbstoffe nach Bestimmungen von *W. Biltz.*

Farbstoff	Konzentration Proz.	Molare Konzentration 10^3 C	α	Osmotischer Druck in cm Wasser: berechn. für $C(1+3\alpha)$ P_{ber}	Osmotischer Druck in cm Wasser: gefunden P_i	A	F
Brillantkongo. Molekulargewicht berechn. = 826,5	0,023	0,278	0,92	25,9	12,8	50,6	68,9
	0,041	0,496	0,89	45,1	21,6	52,1	71,6
	0,0575	0,696	0,86	61,7	32,7	47,0	65,2
	0,082	0,992	0,83	85,7	46,1	46,2	65,7
				$C(1+4\alpha)$		Mittel	68
Kongoreinblau. Molekulargewicht berechn. = 993	0,028	0,282	0,82	29,9	11,7	60,9	79,5
	0,045	0,453	0,76	45,3	20,4	55,0	73,1
	0,073	0,735	0,71	69,9	35,9	48,6	65,7
	0,087	0,876	0,70	82,4	39,6	52,0	70,5
						Mittel	72
Chikagoblau. Molekulargewicht berechn. = 993	0,023	0,232	0,81	24,4	10,5	57,0	74,7
	0,043	0,433	0,74	42,5	20,0	52,9	70,9
	0,045	0,453	0,73	44,0	21,1	52,0	69,8
	0,0664	0,669	0,69	62,3	31,5	49,4	67,3
	0,078	0,785	0,67	71,5	37,0	48,3	66,4
						Mittel	70

Der Dissoziationsgrad wurde aus *Biltz'* Leitbestimmungen nach graphischer Extrapolation zu λ_∞ ausgerechnet. Leider habe ich noch keine Gelegenheit gehabt, mir diese Farbstoffe zu beschaffen und zu reinigen, um ihre Molekülvolumina in Wasserlösung zu untersuchen. Der Farbstoff Chikagoblau $(C_6H_3OCH_3)_2[C_{10}H_3 . NH_2 . OH(SO_3Na)_2]_2$ folgt nach *Biltz Ostwald-Waldens* Regel und der F-Wert 70 (Kolumne 8, Tabelle XVI) ist deshalb besonders wertvoll, weil die Dissoziationsverhältnisse völlig normal sind. Kongoreinblau, das mit Chikagoblau isomer ist, gibt den sehr plausiblen F-Wert 72, Brillantkongo,

$$(C_6H_3CH_3)_2 \begin{matrix} \diagup N_2C_{10}H_4 . NH_2(SO_3Na)_2 \\ \diagdown N_2C_{10}H_5 . NH_2 . SO_3Na \end{matrix},$$

das ein niedrigeres Molekülgewicht hat, gibt einen etwas kleineren F-Wert, 68. Für Kongorot konnte F nicht berechnet werden, weil die Leitfähigkeit (nach *Biltz'* Messungen) asymptotisch gegen die Ordinate aufstieg. Die F-Werte für diese Farbstoffe liegen somit zwischen denen für das Natriumsalz der Taurocholsäure [*H. Hammarsten* (23)]: 56, und für das Natriumsalz der Thymonucleinsäure: (100). Auch die Molekülvolumina jener Farbstoffe müssen zwischen denen dieser beiden Substanzen liegen.

Die oben angeführten Ergebnisse müssen im Lichte der vorher erwähnten Resultate von *H. Hammarsten* (23) über den Zusammenhang

zwischen dem osmotischen Drucke und Molekülvolumen einiger wohldefinierten, hochmolekularen Elektrolyte betrachtet werden. Die Guanyl-, Glykochol- und Taurocholsäuren und deren Natriumsalze, die sich als völlig normale Elektrolyte verhielten, differieren in bezug auf den osmotischen Druck in sehr charakteristischer Weise. Während das Natriumsalz der Guanylsäure mit einem Molekülvolumen von 167 den nach dem Dissoziationsgrad berechneten osmotischen Druck zeigte, gaben die Natriumsalze der Glykochol- und Taurocholsäuren mit den Molekülvolumina 365 und 387 deutliche Abweichungen, indem der osmotische Druck mit steigendem Molekülvolumen niedriger wurde, als man nach dem Dissoziationsgrad hätte erwarten können.

H. Hammarsten hat auch den biologisch außerordentlich wichtigen Fund gemacht, daß die Chloride der basischen Eiweißkörper Protamin und Histon einen niedrigeren Druck gaben, als er aus den Cl-Ionen- konzentrationen allein berechnen konnte. Wenigstens ein Teil der Cl-Ionen war also in diesen Verbindungen osmotisch unwirksam.

In diesem Zusammenhange muß auch auf einige Resultate von *J. Loeb* (5) hingewiesen werden. *Loeb* kommt bei Berechnung und direkter Bestimmung des osmotischen Druckes in Lösungen von Gelatine in Gegenwart von Salzsäure zu dem auffälligen Resultat, daß bei $p_H = 3 - 2$ die aus der Verteilung der H- und Cl-Ionen allein (nach *Donnan*) berechneten Drucke gleich mit den gefundenen oder sogar ein wenig höher als diese waren. In der Tat hätte man erwarten können, daß die für nur H- und Cl-Ionen berechneten Drucke, dem nicht unbedeutenden Drucke des stark dissoziierten Proteins entsprechend, hätten niedriger sein müssen als die gefundenen. *Loeb* hat indessen in den meisten Versuchen die Cl-Ionenkonzentrationen in den Innenflüssigkeiten in seinen osmotischen Versuchen nicht direkt gemessen, sondern aus der Wasserstoffionenkonzentration nach *Donnans* Formel berechnet. *Loeb* sagt hierüber folgendes:

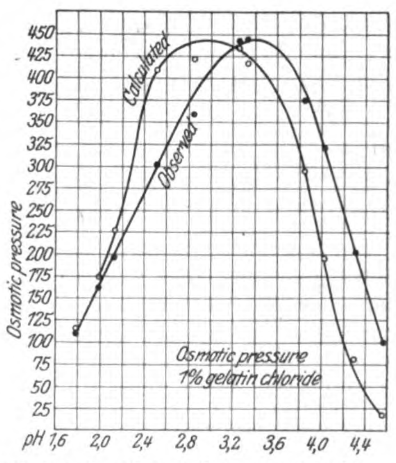


Abb. 9 (= Fig. 45, *Loeb*, Proteins and the Theory of Colloidal Behavior).

„The curves representing the values for *calculated* osmotic pressures differ in one or two respects from the curves representing the values for the *observed* osmotic pressures (Fig. 45).

As a rule, the calculated values are lower than the observed values [though this is only partly true for Fig. 45[1])]. This is to be expected since the calculated curves do not include that part of the osmotic pressure which is due to the protein particles and the calculated curves must therefore be too low, ***though this is (perhaps accidentally) not true for the descending part of the curve (for lower p_H) in Fig.*** **45**[2]). The slight discrepancies between observed and calculated values may be due to an uncertainty in our calculations or to a simplification in our assumption which is not justified. We assume, e. g., complete electrolytic dissociation of all compounds, which may not be entirely correct.

The discrepancies may also be due to an error in calculating z[3]). We calculated z from $\frac{(x+y)(x-y)}{y}$ [3]) where x and y were the hydrogen ion concentrations determined electrometrically. There is a second way of measuring z, namely, by determining the concentration of Cl inside a 1 per cent gelatin chloride solution by titration. The Cl inside is partly in combination with H (free HCl) and partly combined with gelatin. By titrating with NaOH to $p_H = 7{,}0$ and making the correction for isoelectric gelatin (as described in Chap. IV) we determine the value $z + y$. y is known from the p_H and by deducting y, we get z. We made such determinations at the end of an osmotic experiment and calculated z also from $\frac{(x+y)(x-y)}{y}$ in the same experiment. Table XXXIV gives a comparison of the values of z obtained in identical solutions by the two different methods.

Table XXXIV.

Concentrations of $z \times 10^6$ N.

p_H of gelatin solution	4,51	4,26	3,96	3,61	3,53	3,32	3,23	2,86	2,32	2,16	1,93
z calculated from $\frac{(x+y)(x-y)}{y}$	30	90	166	223	252	316	387	493	570	687	687
z found by titration	17	84,5	170	275	291	342	401	532	548	838	885

There is no wide divergense between the too sets of values, yet enough to suggest that the calculated values of z may be chiefly responsible for the descrepansy between calculated and observed curves. The reader must remember that the value of z is multiplied by 2,5 in the calculations of the osmotic pressure (and, therefore, any error in the calculated osmotic pressure is multiplied in the same way)."

Die Fehlerquellen sind also nicht sicher schätzbar. Wären *Loebs* Resultate in der Hinsicht richtig, daß der nach der Ionenverteilung allein berechnete Druck und der gefundene Totaldruck gleich hoch sind, dann würde dies bedeuten, daß Cl-Ionen und wohl auch andere kleine

---

[1]) Der osmotische Druck ist in mm Wasser angegeben.

[2]) Kursiviert von *E. Hammarsten.*

[3]) z = Konzentration der Cl-Ionen in Eiweißbindung. x = Wasserstoffionenkonzentration in der Außenflüssigkeit. y = Wasserstoffionenkonzentration in der Innenflüssigkeit.

Ionen in Ampholyt-Eiweißbindung wenigstens teilweise osmotisch unwirksam sind.

Arrhenius (28) hat gefunden, daß die Salze einiger zweiwertigen Metalle (Cd, Mg) nur in verdünnter Lösung einen Faktor i, aus dem Gefrierpunkt berechnet, geben, der gleich demselben Faktor ist, aus dem Leitvermögen erhalten. Bei CdJ_2 und $MgSO_4$ sinkt das Verhältnis $i_{osm.}/i_{Leitv.}$ mit steigender Konzentration, bei $MgCl_2$ steigt es. Bei kleineren Konzentrationen als einigen Hundertsteln Normalität erfüllen aber alle die 40 von *Arrhenius* untersuchten Salze die Forderung, daß $i_{sm.}/i_{Leitv.} = 1$ sein soll. Zu ähnlichen Resultaten ist auch *de Vries* (29) gekommen. Dieses Verhältnis ist, wie meine Versuche zeigen, bei allen den untersuchten hochmolekularen Elektrolyten immer kleiner als 1 und innerhalb dem angewendeten Konzentrationsbereich völlig unabhängig von der Konzentration.

Derartige individuellen Unterschiede der Elektrolyte in ihren osmotischen Eigenschaften sind neulich von *Bjerrum, Debye* und *Hückel* und *Debye* (17) näher analysiert worden. Als Unterlage für die Berechnungen verwendet *Bjerrum* nur wirkliche Präzisionsmessungen der Gefrierpunkte. Von *Milners* Hypothese ausgehend, findet er unter anderem, daß die osmotischen Eigenschaften eine Funktion der Größe der Ione in der Richtung sind, daß der Druck mit sinkender Größe der Ionen sich vermindert, indem die interionischen Kräfte der entgegengesetzt geladenen Ione mit abnehmendem Ionenvolumen zunehmen. Zu ähnlichen Resultaten sind *Debye* und *Hückel* durch ihre Berechnungen gekommen.

Die von *E.* und *H. Hammarsten* gefundene osmotische Abweichung bei hochmolaren Elektrolyten konnte mit dem Verhältnis der Volumina der entgegengesetzt geladenen Ionen in Zusammenhang gebracht werden, und diese Abweichung, im Gegensatz zu derjenigen bei den niederen Elektrolyten, bestand unverändert bei sehr großen Verdünnungen. Für die Thymonucleinsäure und ihr Natriumsalz könnte man vielleicht nach *Bjerrum* annehmen, daß der niedrige Druck wenigstens zum Teil durch die Polyvalenz des Nucleinsäureanions zustande kommt. Diese Betrachtungsweise ist aber für die einwertigen Glyko- und Taurocholsäuren nicht anwendbar, weshalb ich es vorläufig vorgezogen habe, nur die experimentell gefundene Abhängigkeit des Druckes vom Volumenverhältnis der Ionen in Betracht zu ziehen.

An dieser Stelle müssen auch einige Versuche von *F. Krafft* und seinen Mitarbeitern (30) und *Moore* und *Parker* (31) über den osmotischen Druck von Seifenlösungen kurz besprochen werden. *Krafft* hat bei Messungen der Kochpunkte bei den Alkalisalzen der Fettsäuren stark abnorme osmotische Drucke gefunden. Die Alkalisalze der Fettsäuren sind in Wasserlösung hydrolytisch gespalten und die der höheren Säuren

stark zu Gelbildung geneigt. Außerdem zeigen die Messungen, daß die Kochpunkte sowohl mit der Zeit als mit der Konzentration außerordentlich variabel sind, in konzentrierten Lösungen sogar zu dem Kochpunkte des Wassers abfallen, was alles einen sehr veränderlichen kolloiden Zustand anzeigt. Die Deutung dieser Abnormitäten ist durch so mannigfaltige Varianten kompliziert, daß es vorläufig wohl unmöglich ist, darüber aus *Kraffts* Versuchen eine sichere Auffassung zu gewinnen.

Moore und *Parker* haben bei direkten Messungen des osmotischen Druckes bei verdünnten (etwa 0,5proz.) Seifenlösungen konstante, aber sehr niedrige Drucke gefunden, aus denen sie zu Molekulargewichten kommen, die 30- bis 60mal größer als die berechneten sind. Da keine organische Substanz und auch kein Alkali in ihren Versuchen durch die Membran (Pergament) passierten, schließen sie daraus, daß die Seifen sich nicht in molekulardispersem Zustande in Wasserlösung befanden und nicht dissoziiert waren. Es sagt sich von selbst, daß aus *Kraffts* oder *Moore* und *Parkers* Versuchen in bezug auf den osmotischen Druck keine quantitativen Schlüsse gezogen werden dürfen, da sie nicht den Hydrolysegrad bestimmt und nicht dem Effekt der Hydrolyse Rechnung getragen haben.

Schlußfolgerungen.

1. *De Vries-van 't Hoffs* Faktor i ist in Lösungen von Elektrolyten mit ungleich großen Ionen bei sehr großem Verhältnis zwischen den Volumina des großen und des kleinen Ions gleich 1. Bei Verminderung dieses Verhältnisses steigt der Faktor i, um zuletzt in bekannter Weise den Dissoziationsgrad auszudrücken.

2. Vorausgesetzt, daß die Thymonucleinsäure in der lebenden Zelle abwechselnd in Salzbindung mit großen (z. B. Eiweiß, Aminosäuren) und kleinen (z. B. Na-, H_4N-, H- usw.) Ionen vorkommen kann, so muß dies eine Osmosregulation von ganz besonderer Art und von großer Bedeutung ermöglichen.

3. Kleine Ionen in Eiweißbindung sind wahrscheinlich osmotisch teilweise oder ganz unwirksam.

Abteilung V.

Über den Donnaneffekt beim Natriumsalze der Thymonucleinsäure.

Wenn Na_4-T. in Wasserlösung durch eine für das Anion impermeable Membran gegen eine andere Natriumsalzlösung abgeschlossen ist, für deren beide Ionen die Membran permeabel ist, so muß sich nach *Donnan* (8) die Ionenverteilung folgendermaßen gestalten:

Innen (i)	Außen (a)
Na T	Na_a
Na_i Cl_i	Cl_a

$$(Na + Na_i)\,Cl_i = Na_a \,.\, Cl_a$$

wo Na und T die Konzentrationen der Ionen von Na_4-T. und Na_i, Cl_i, Na_a, Cl_a diejenigen der Ionen von Kochsalz bedeuten. Cl_a muß also im Gleichgewicht größer sein als Cl_i, und das Kochsalz auf der Seite a sich im Gleichgewicht in größerer Konzentration als auf der Seite i befinden. Bezeichnet man mit C die Konzentration des zugesetzten Na_4-T. und mit α dessen Dissoziationsgrad, so würde nach *Donnan*

$$Cl_i\ (Cl_i + 4\,C\,\alpha) = Cl^2_a.$$

Der osmotische Druck von Na_4-T. muß also mit einem Drucke, entsprechend dem Überschuß an Kochsalz auf der Seite a gesenkt werden. *Donnan* hat seine Theorie auf verschiedene Systeme geprüft und dabei überall jedenfalls eine qualitative Übereinstimmung in der Ionenverschiebung gefunden. Der Verlauf zum Gleichgewicht scheint doch komplizierter sein zu können, als die Formel angibt (8d). Es steht aber nach allen Prüfungen auch von *Donnans* Nachfolgern *Procter*, *Wilson* und *J. Loeb* fest, daß, sobald ein System mit einer Membran und einem dadurch nicht diffusiblen Ion vorliegt, der osmotische Druck dieses Systems in hohem Grade von diffusiblen Elektrolyten beeinflußt wird. Solche Systeme sind nun beinahe gesagt überall in den Zellen vorhanden, und der Donnaneffekt muß deshalb für die Osmosregulation im Organismus eine enorme Bedeutung haben. Dies hat schon *Donnan* selbst eingesehen (8).

Procter und *Wilson* (7) haben *Donnans* Theorie auf die Schwellungsvorgänge in sauren Gelatinelösungen angewendet und ihre Gültigkeit mathematisch festgestellt. Ebenso hat *J. Loeb* die Einwirkung von Kat- und Anionen auf den osmotischen Druck einiger Eiweißsalze mit *Donnans* Gesetz erklären können. Das Gesetz ist ja aber nur bei Grenzschichten gültig, die für gewisse Elektrolyte semipermeabel sind und bei Zellmembranen besonders da, wo hochmolekulare Elektrolyte zusammen mit diffusiblen Elektrolyten vorkommen. Es ist dann auch klar, daß die neutralen Eiweißstoffe nur in einiger Entfernung von ihrem isoelektrischen Zustande, wo sie als Salze vorkommen, irgend einen bedeutenden Donnaneffekt zeigen können, was auch durch *J. Loebs* Versuche nachgewiesen worden ist. Von biologischem Gesichtspunkte aus muß man sich dann fragen, ob diese Eiweißstoffe in den Zellen als Osmosregulatoren nach dem Donnaneffekt wirksam sein können. Während Hämoglobin z. B. mit einem isoelektrischen Punkte in der Nähe von 7 wohl bei der fast neutralen Reaktion im Plasma und Blutkörperchen keinen starken Donnaneffekt zeigen kann, liegt die Sache etwas anders für Eiweißstoffe mit einem isoelektrischen Punkte von zwischen 4 und 5 (z. B. Serumalbumin). Unbedeutend muß aber die osmosregulatorische Kraft dieser Stoffe in Hinsicht des Donnaneffektes sein im Vergleich mit derjenigen von ausgeprägten Säuren und Basen, wie Nucleinsäuren und basischen Eiweißstoffen.

Da diese Substanzen Salze bei neutraler Reaktion bilden, muß ein starker Donnaneffekt durch Neutralsalze schon bei neutraler Reaktion hervorgerufen werden, unter Bedingungen also, die in den lebenden Zellen möglich sind.

Dies hat sich auch bei Versuchen mit dem vierbasischen neutralen Natriumsalz der Thymonucleinsäure bestätigt.

Der osmotische Druck dieser Verbindung ist außerordentlich „empfindlich“ gegen Neutralsalze.

Abb. 10 gibt die Resultate der osmotischen Messungen an salzhaltigen Lösungen von Na_4-T. wieder. Die Druckwerte wurden aus den gefundenen osmotischen Drucken (Tabelle XXIII, Kolumne 11, Tabelle XXIV, Kolumne 8, Tabelle XXV, Kolumne 7) mittels graphischer Interpolation auf eine und dieselbe Konzentration (92 mg-Proz. Stickstoff = 0,0044 mol. Nucleinsäure pro Liter) reduziert.

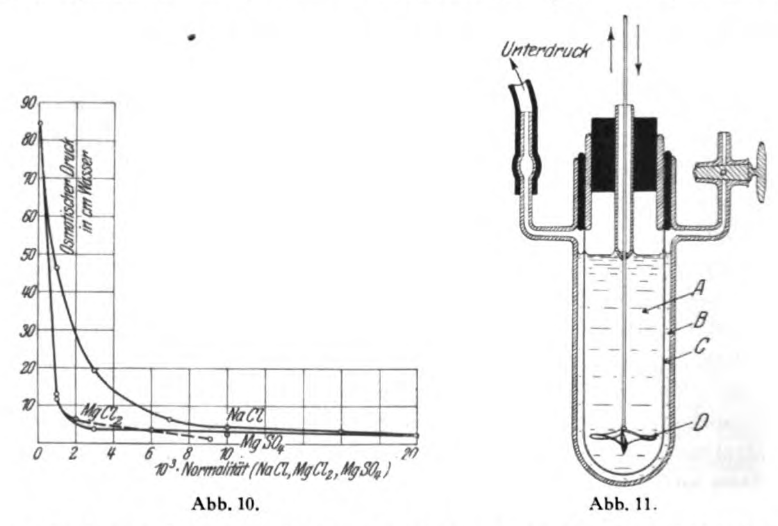


Abb. 10. Abb. 11.

Die Senkung des osmotischen Druckes schon durch n/1000 NaCl-Lösung mit etwa 50 Proz. ist auffällig groß. Alle die osmotischen Versuche in salzhaltigen Lösungen (Tabellen XXII bis XXV) wurden in der Weise ausgeführt, daß die Außen- und Innenflüssigkeiten von Anfang an dieselben Konzentrationen an NaCl, bzw. $MgCl_2$ und $MgSO_4$ hatten. Zwei Messungen des Druckes wurden nach 24 bzw. 48 Stunden nach dem Beginn der Versuche gemacht. Die Volumina der Innenflüssigkeiten waren in den meisten Versuchen 11 bis 12 ccm, die der Außenflüssigkeiten 150 bis 250 ccm. In einigen Versuchen wurde dieses Verhältnis geändert, indem die Innenflüssigkeiten 140 bis 200 ccm betrugen, die Außenflüssigkeiten nur etwa 70 ccm. Während der Dialyse wurde in diesen Versuchen kohlensäurefreie Luft nicht durch

die Außenflüssigkeiten geleitet. Die osmotischen Drucke wurden hier nicht gemessen, sondern durch graphische Interpolation berechnet. Diese Werte sind in Tabelle XXIII, Kolumne 11, eingeklammert. Die Versuchsanordnung in diesen Versuchen geht aus Abb. 11 hervor.

Es wurde mittels der Propeller für stetige Umrührung in den Innenflüssigkeiten gesorgt. Durch Unterdruck in den Außenflüssigkeiten, entsprechend den berechneten Druckwerten, wurde eine allzu starke Wasserverschiebung verhindert. In jedem dieser Versuche wurden vier Stickstoffanalysen und zwei Chlorionenmessungen vor und nach der Dialyse gemacht.

Tabelle XVII.

Wasserstoffionenkonzentration vor und nach Dialyse.
(Natriumsalz der Thymonucleinsäure + NaCl, $MgCl_2$ und $MgSO_4$.)

Salz	Normalität . 10^3 vor Dialyse	I/A	p_H innen vor Dialyse	p_H innen nach Dialyse	p_H außen nach Dialyse
NaCl	1,4	104/926	6,61	6,25	6,40
	3,4	104/926	6,58	6,58	—
	9,4	114/930	6,61	6,73	6,39
	9,4	190/120	6,42	6,31	—
	27,4	114/930	6,58	6,63	—
$MgCl_2$	2,4	140/70	6,53	5,96	—
	6,4	140/70	6,15	5,90	6,44
	9,4	140/70	6,54	6,23	—
$MgSO_4$	1,4	140/70	6,45	6,27	—
	3,4	140/70	6,29	6,44	6,51

Die Tabelle XVII zeigt, daß bei der Dialyse keine hier meßbare Hydrolyse stattgefunden hatte, denn die Reaktion war außen nicht mehr alkalisch als innen. Zwar waren die p_H-Werte variierend, was wohl teils auf verschiedene Kohlensäurespannung, teils auf eine gewisse Unempfindlichkeit der Wasserstoffelektroden gegen diese Lösungen beruhte. Die Differenzen waren in keiner Weise systematisch.

Tabelle XVII zeigt einige Messungen der Wasserstoffionenkonzentration in diesen Versuchen, woraus zu sehen ist, daß keine Hydrolyse eingetreten war, die man zu berücksichtigen brauchte. In den anderen Versuchen, wo der osmotische Druck gemessen wurde, konnten Cl-Ionenmessungen nicht ausgeführt werden, weil die Innenflüssigkeiten nicht ausreichten. Die Ionenverteilung wurde hier aus dem Leitvermögen berechnet.

Von den Versuchslösungen wurde immer ein Teil vor dem Beginn der Versuche gespart und gleichzeitig mit den Innen- und Außenflüssigkeiten auf Stickstoffgehalt, Interferometerzahlen und Leitvermögen analysiert. Um die Beurteilung der Resultate zu ermöglichen,

wurden in besonderen Versuchsreihen Bestimmungen von Leitvermögen und Interferometerzahlen in Na_4-T.-Lösungen mit und ohne Kochsalz ausgeführt.

Tabelle XVIII.

Interferometerwerte und Leitvermögen des Natriumsalzes der Thymonucleinsäure.

Mg N auf 100 ccm	Trommelteile (10 mm Kammer)	Spez. elektr. Leitvermögen . 10⁴	Mg N auf 100 ccm	Trommelteile (10 mm Kammer)	Spez. elektr. Leitvermögen . 10⁴
0,2	—	0,14	91,6	812	—
1,2	—	0,21	92,5	831	5,75 [2])
28,4	—	1,78 [1])	93,0	834	5,40 [1])
22,0	—	—	94,0	832	5,44
28,7	—	1,84	95,0	—	5,50
66,7	610	4,25 [2])	94,3	—	5,43
73,5	674	—	94,3	—	5,43
75,0	690	4,35	96,0	846	5,56 [1])
78,0	710	4,56	97,0	862	5,98 [2])
84,0	764	4,91	98,0	864	6,05 [2])
83,0	757	5,19 [2])	102,0	908	6,31
87,5	786	5,45 [2])	103,0	919	6,33
90,0	—	5,23 [1])	107,0	933	—
92,0	820	5,33	116,5	1019	7,05
92,3	—	5,34	122,0	1071	7,58

Die Tabelle XVIII wurde zur Aufstellung von Interpolationskurven benutzt, mittels welcher das Leitvermögen und die Interferometerzahlen für Änderungen in dem Stickstoffgehalt (Tabelle XXII) durch Dialyse korrigiert wurden.

Die Zahlen Kolumne 3 und 4 (Tabelle XIX) wurden mittels graphischer Interpolationskurven für Na_4-T.-Lösungen (Tabelle XVIII) und kohlensäurefreie Kochsalzlösungen erhalten. Die prozentische Hemmung des Leitvermögens zeigte bei den Kochsalzkonzentrationen 0,001 bis 0,003 n einen Mittelwert 1,5 mit einer mittleren Abweichung für jede Observation von $\pm$ 0,8. Die entsprechenden Zahlen im Konzentrationsgebiet 0,005 bis 0,02 n waren 4,2 und $\pm$ 0,8. Diese mittlere Abweichung kann als ein Maß über die Genauigkeit der Messungen und Berechnungen dienen.

Die Werte Kolumne 3 und 4 (Tabelle XX) wurden aus Interpolationskurven für Na_4-T. (Tabelle XVIII) und NaCl-, $MgCl_2$- und $MgSO_4$-Lösungen erhalten. Die Tabelle zeigt, daß die Interferometerwerte sich additiv aus denen für die verschiedenen Salze zusammensetzten, indem die mittlere Abweichung der einzelnen Observation vom Berechneten = $\pm$ 5,5 war, und also nur etwas außerhalb der Grenzen für die Genauigkeit der Ablesung ($\pm$ 3 bis 4) lag. Die Tabelle zeigt auch, daß NaCl, $MgCl_2$ und $MgSO_4$ in den angewandten Konzentrationen keine mit dem Interferometer meßbare Einwirkung auf den Dispersitätsgrad von Na_4-T. gehabt hatten.

[1]) Dialysiert in 3 Tagen $I/A = {}^1/_{10}$.

[2]) Diese Lösungen von Na_4-T. enthielten ein wenig mehr Kochsalz, weshalb die Leitfähigkeitswerte etwas höher waren.

Tabelle XIX.

Leitvermögen des Natriumsalzes der Thymonucleinsäure in salzhaltigen Lösungen.

Mg N auf 100 ccm I	Normalität . 10^3 von zugesetztem Salz II	$K_{20} . 10^4$ berechnet für I	II	I + II $K_{ber.}$	$K_{20} . 10^4$ gefunden $K_{gef.}$	$K_{gef.} - K_{ber.}$	Hemmung pro 92 mg-Proz. N in Proz. von $K_{ber.}$
78,5	NaCl 1,00	4,55	1,06	5,61	5,55	—0,06	1,3
91,5	1,41	5,30	1,46	6,76	6,64	—0,12	1,8
91,5	1,41	5,30	1,46	6,76	6,68	—0,08	1,2
92,5	1,00	5,38	1,06	6,44	6,39	—0,05	0,8
96,0	1,00	5,55	1,06	6,61	6,59	—0,02	0,3
96,0	1,00	5,55	1,06	6,61	6,59	—0,02	0,3
96,5	1,43	5,60	1,47	7,07	6,94	—0,13	1,8
91,0	2,41	5,28	2,53	7,81	7,77	—0,04	0,5
78,5	3,00	4,55	3,15	7,70	7,54	—0,16	2,4
91,5	3,41	5,30	3,57	8,87	8,67	—0,20	2,3
91,5	3,41	5,30	3,57	8,87	8,67	—0,20	2,3
92,5	3,00	5,38	3,15	8,53	8,31	—0,22	2,6
96,0	3,00	5,55	3,15	8,70	8,50	—0,20	2,2
96,5	3,43	5,60	3,59	9,19	8,85	—0,34	3,5
91,0	4,41	5,28	4,59	9,87	9,44	—0,43	4,4
92,5	5,00	5,38	5,19	10,57	10,14	—0,43	4,0
78,5	7,00	4,55	7,19	11,74	11,36	—0,38	3,8
92,5	7,00	5,38	7,19	12,57	12,06	—0,51	4,0
96,0	7,00	5,55	7,19	12,74	12,30	—0,44	3,3
67,0	8,30	3,93	8,50	12,43	12,31	—0,12	1,3
91,0	8,41	5,28	8,60	13,88	13,28	—0,60	4,4
122,0	8,55	7,20	8,74	15,94	15,08	—0,86	4,1
91,0	9,41	5,28	9,60	14,88	14,17	—0,71	4,8
91,5	9,41	5,30	9,60	14,90	14,21	—0,69	4,7
78,5	10,00	4,55	10,19	14,74	14,08	—0,66	5,2
92,5	10,00	5,38	10,19	15,57	14,81	—0,76	4,9
96,0	10,00	5,55	10,19	15,74	14,98	—0,76	4,6
96,0	10,00	5,55	10,19	15,74	15,00	—0,74	4,5
92,5	14,00	5,38	14,07	19,45	18,60	—0,85	4,3
96,0	16,00	5,55	16,03	21,58	20,60	—0,98	4,4
92,5	17,10	5,38	17,10	22,48	21,38	—1,10	4,9
92,5	20,00	5,38	19,92	25,30	24,17	—1,13	4,4
96,0	20,00	5,55	19,92	25,47	24,34	—1,13	4,3
96,0	20,00	5,55	19,92	25,47	24,34	—1,13	4,3

Die Tabelle XXI zeigt, daß die Interferometerzahlen von kochsalzhaltigen Na_4-T.-Lösungen auch nach Dialyse in derselben Weise wie vor Dialyse (Tabelle XX) additiv waren [wenn auch die mittlere Abweichung hier etwas größer war ($\pm$ 8,8)]. Die Kochsalzkonzentrationen wurden aus der Leitfähigkeit (Tabelle XXII) berechnet, was für die Beweisführung streng genommen nicht richtig wäre. Die relativ kleinen Änderungen in den Kochsalzkonzentrationen durch Dialyse sind aber im Vergleich mit denen des Na_4-T. ohne Bedeutung. Na_4-T. war also in bezug auf den Dispersitätsgrad nicht verändert worden.

Tabelle XX. Interferometerwerte in salzhaltigen Lösungen des Natriumsalzes der Thymonucleinsäure vor Dialyse.

mg N in 100 ccm II	Salz,	Normalität 10^3 I	Trommelteile (10 mm Kammer) I berechnet	II berechnet	I + II berechnet	I + II gefunden	$I_{gef.} - I_{ber.}$ Δ
45,0	NaCl	1	8	442	450	450	± 0
45,0		3	25	442	467	465	— 2
45,0		7	59	442	501	496	— 5
45,0		10	84	442	526	530	+ 4
45,0		20	166	442	608	614	+ 6
97,5		1	8	868	876	876	± 0
91,5		1	8	818	826	837	+11
92,0		1	8	824	832	832	± 0
95,8		1	8	854	862	860	— 2
95,8		1	8	854	862	864	+ 2
96,5		1	8	860	868	861	— 7
91,4		2	18	818	836	832	— 4
91,0		3	25	814	839	839	± 0
97,5		3	25	868	893	882	—11
91,0		3	25	814	839	841	+ 2
96,5		3	25	860	885	884	— 1
91,4		4	34	818	852	853	+ 1
97,5		7	59	868	927	926	— 1
91,4		8	67	818	885	880	— 5
67,0		8	67	618	685	674	—11
91,5		9	76	818	894	897	+ 3
91,0		9	76	814	890	881	— 9
97,5		10	83	868	951	948	— 3
96,0		10	83	854	937	937	± 0
91,4		18	150	818	968	968	± 0
96,0		20	166	854	1020	1023	+ 3
97,5		20	166	868	1034	1032	— 2
91,0		27	225	814	1039	1035	— 4
91,3	$MgCl_2$	1	8	817	825	817	— 8
96,5		2	18	860	878	882	+ 4
96,5		2	18	860	878	874	— 4
90,0		2	18	808	826	839	+13
96,5		6	50	860	910	905	— 5
90,0		6	50	808	858	857	— 1
91,3		9	76	817	893	892	— 1
94,0	Na_2SO_4	1	8	839	847	837	—10
94,0		3	25	839	864	858	— 6
45,0	$MgSO_4$	1	8	442	450	446	— 4
45,0		3	25	442	467	463	— 4
45,0		7	59	442	501	502	+ 1
45,0		10	83	442	525	533	+ 8
45,0		20	166	442	608	614	+ 6
97,5		1	8	868	876	870	— 6
94,0		1	8	839	847	853	+ 6
91,3		1	8	817	825	830	+ 5
97,5		3	25	868	893	889	— 4
91,3		3	25	817	842	848	+ 6
97,5		7	59	868	927	927	± 0
94,0		10	83	839	922	931	+ 9
97,5		10	83	868	951	960	+ 9
93,4		20	166	834	1000	1000	± 0
97,5		20	166	868	1034	1028	— 6

Tabelle XXI.

Interferometerwerte des Natriumsalzes der Thymonucleinsäure nach Dialyse.

I mg N auf 100 ccm	II NaCl, Normalität . 10^3	Trommelteile (10 mm Kammer) I berechnet	II berechnet	I + II berechnet	I + II gefunden	gef. — ber.$_{I+II}$
96	0,5	854	6	860	868	+ 8
80	1	725	8	733	734	+ 1
94	0,4	839	5	844	850	+ 6
92	0,9	824	5	829	841	+12
98	2	880	18	898	892	— 6
86	3	774	25	799	800	+ 1
87	3	782	25	807	816	+ 9
96	7,8	854	64	918	918	± 0
92	9	824	75	899	887	—12
94	8,6	839	74	913	922	+ 9
94	18	839	150	989	1006	+17
94	25	839	208	1047	1053	+ 6

Das Leitvermögen und die Interferometerwerte von Na_4-T. in kochsalzfreien oder kochsalzhaltigen Lösungen (Tabellen XVIII bis XXI) und dieselben Werte für reine Kochsalzlösungen (diese Werte sind nicht angegeben) wurden also für verschiedene Konzentrationen bestimmt. Die Na_4-T.-Lösungen waren nicht kohlensäurefrei, und die Leitfähigkeitswerte wurden nicht wie in den Versuchen Tabelle III korrigiert. Aus der Kurve für die Leitfähigkeit von Na_4-T. (Tabelle XVIII) wurden die Leitfähigkeitswerte (Tabelle XXII) für die Änderungen durch die Dialyse im Stickstoffgehalt durch graphische Interpolation korrigiert. Die Leitfähigkeitswerte, Kolumne 7 und 13, Tabelle XXII, wurden also in dieser Weise zu demselben Stickstoffgehalt wie in der Vergleichsflüssigkeit vor der Dialyse korrigiert (Kolumne 8 und 14, Tabelle XXII). Da Lösungen von Na_4-T. durch Dialyse weder in bezug auf Leitfähigkeit noch auf Interferometerzahlen (Tabellen XVIII, XX, XXI) sich änderten und in dem untersuchten Konzentrationsgebiet der Konzentration streng proportional waren (Tabelle XVIII), erscheint dieses Korrektionsverfahren berechtigt. Es war notwendig, die Lösungen vor und nach Dialyse in exakt der gleichen Zeit nach der Bereitung zu analysieren, weil die Leitfähigkeit sich mit der Zeit ziemlich stark änderte (s. S. 445). Alle Messungen der Leitfähigkeit und Interferometerzahlen, die hier in Betracht kommen, wurden deshalb 72 Stunden nach der Bereitung der Lösungen ausgeführt. Wie aus Tabelle XXII zu sehen ist, waren die Leitfähigkeitswerte nach der Dialyse mit denen vor der Dialyse verglichen, kleiner in den Innen- und höher in den Außenflüssigkeiten geworden, was einer Salzverschiebung im Sinne *Donnans* entspricht. Die Größe der Änderungen innen und außen war natürlich vom Volumverhältnis der Innen- und Außenflüssigkeiten abhängig. Ich habe, wie oben erwähnt, die Differenzen zwischen den

Tabelle XXII.

Das Natriumsalz der Thymonucleinsäure in osmotischem Gleichgewicht mit Kochsalz.

Nr.	Volumen innen / Volumen außen	Normaliät . 10^3 vom zugesetzten Kochsalz	Innenflüssigkeit: mg Stickstoff auf 100 ccm, vor Dialyse N_I	Innenflüssigkeit: mg Stickstoff auf 100 ccm, nach Dialyse N_{II}	Innenflüssigkeit: Spezifisches elektrisches Leitvermögen . 10^4, vor Dialyse K_I	Innenflüssigkeit: Spezifisches elektrisches Leitvermögen . 10^4, nach Dialyse K_{II}	Innenflüssigkeit: Spezifisches elektrisches Leitvermögen . 10^4, nach Dialyse K_{II} korr.	$K_I - K_{II}$ korr.	Normalität . 10^3 von Kochsalz nach d. Dialyse, berechnet aus $K_I - K_{II}$ korr.	Außenflüssigkeit: Normalität . 10^3 vom zugesetzten Kochsalz	Außenflüssigkeit: mg Stickstoff auf 100 ccm	Außenflüssigkeit: Spezifisches elektrisches Leitvermögen . 10^4 nach der Dialyse, K	Außenflüssigkeit: Spezifisches elektrisches Leitvermögen . 10^4 nach der Dialyse, $K_{korr.}$	Außenflüssigkeit: Normalität . 10^3 von Kochsalz nach der Dialyse, berechnet aus $K_{korr.}$
1	190/120	1,4	96,5	92,0	6,94	6,12	6,42	0,52	0,90	1,0	0,15	2,06	2,02	1,85
2	11/155	1,0	78,5	77,0	5,55	4,75	4,80	0,75	0,27	1,0	0,10	1,30	1,27	1,06
3	104/926	1,4	91,5	96,2	6,64	5,99	5,74	0,90	0,52	1,0	0,03	1,40	1,39	1,18
4	11/157	1,0	96,0	93,0	6,59	5,61	5,83	0,76	0,25	1,0	0,04	1,30	1,29	1,08
5	11/215	1,0	96,0	94,0	6,59	5,83	5,99	0,60	0,42	1,0	0,04	1,21	1,20	1,00
6	104/926	3,4	91,4	98,0	8,67	7,77	7,39	1,28	2,16	3,0	0,00	3,51	3,51	3,35
7	140/70	3,4	96,5	87,0	8,85	7,93	8,43	0,42	3,00	3,0	0,36	4,63	4,56	4,43
8	11/300	3,0	78,5	75,0	7,54	6,31	6,48	1,06	2,00	3,0	0,14	3,32	3,28	3,13
9	11/215	3,0	95,8	93,0	8,50	7,11	7,33	1,17	1,87	3,0	0,05	3,38	3,37	3,23
10	11/155	7,0	78,6	75,0	11,36	9,94	10,11	1,25	5,78	7,0	0,15	7,63	7,59	7,55
11	11/146	7,0	95,8	94,0	12,10	10,58	10,75	1,35	5,69	7,0	0,11	7,75	7,72	7,65
12	190/120	9,4	91,3	92,4	14,17	13,90	13,82	0,35	9,07	9,0	0,12	10,97	10,94	10,90
13	114/930	9,4	91,6	96,0	14,21	12,44	12,64	1,57	7,88	9,0	0,04	9,93	9,92	9,85
14	11/155	10,0	78,6	75,8	14,08	12,74	12,84	1,24	8,81	10,0	0,13	10,25	10,22	10,15
15	11/211	10,0	95,8	94,0	14,98	13,00	13,17	1,81	8,25	10,0	0,02	10,15	10,14	10,08
16	11/162	10,0	95,8	94,0	15,00	13,33	13,50	1,50	8,55	10,0	0,04	10,41	10,40	10,30
17	11/141	16,0	95,8	93,0	20,60	18,24	18,46	2,14	13,96	16,0	0,12	16,23	16,20	16,20
18	11/211	20,0	95,8	93,0	24,34	21,75	21,97	2,37	17,72	20,0	0,13	20,00	19,97	19,97
19	11/215	20,0	95,8	94,0	24,34	21,85	22,04	2,30	17,79	20,0	0,04	19,87	19,86	19,86
20	114/930	27,4	91,4	93,8	32,70	30,30	30,15	2,55	24,93	27,0	0,07	27,52	27,51	27,50

Tabelle XXIII.

Die Ionenverteilung und der osmotische Druck in den Versuchen Tabelle XXII.

Molare Konzentration . 10^3 von Na_4T. c	[Cl] . 10^3 innen Cl_i	[Cl] . 10^3 außen Cl_a	$Cl_i (Cl_i + c) . 10^6$ I	$Cl_i (Cl_i + c . 0,78) . 10^6$ II	$Cl_a^2 . 10^6$ III	II — III in Proz. von II Δ	Osmotische Konzentration . 10^3 des Kochsalzes innen O_i	außen O_a	$O_a - O_i$	Osmotischer Druck in cm Wasser gefunden P_i	berechnet $P_{ber.}$
4,38	0,90*. 0,88	1,79	4,75*. 4,63	3,88*. 3,78	3,20	+ 17,5*. + 15,4	1,82*. 1,78	3,64	1,82*. 1,86	(45,1)	+ 39,6*. + 38,6
3,66	0,27	1,04	1,06	0,84	1,08	— 28,6	0,54	2,10	1,56	32,5	+ 32,0
4,57	0,51	1,16	2,59	2,07	1,35	+ 34,8	1,03	2,33	1,30	(49,5)	+ 56,0
4,43	0,25	1,06	1,17	0,93	1,12	— 20,4	0,50	2,14	1,64	45,4	+ 45,1
4,47	0,41	0,98	2,00	1,59	0,96	+ 39,6	0,83	1,98	1,15	50,7	+ 57,7
4,66	2,02*. 2,10	3,22	13,49*. 14,20	11,41*. 12,03	10,40	+ 8,8*. + 13,5	4,09*. 4,25	6,57	2,48*. 2,32	(22,0)	+ 28,5*. + 32,5
4,13	3,00*. 2,88	4,21	21,42*. 20,19	18,66*. 17,57	17,72	+ 5,0*. — 0,8	6,11*. 5,89	8,66	2,55*. 2,77	(16,8)	+ 16,6*. + 11,2
3,57	1,94	3,00	10,69	9,16	9,00	+ 1,7	3,94	6,14	2,20	11,5	+ 14,4
4,42	1,81	3,10	11,28	9,52	9,61	— 0,9	3,68	6,33	2,65	19,6	+ 19,6
3,57	5,49	7,09	49,74	45,4	50,30	— 10,8	11,25	14,65	3,40	3,4	— 15,4
4,47	5,41	7,19	53,45	48,10	51,70	— 7,5	11,08	14,83	3,75	6,4	— 6,7
4,40	9,07*. 8,53	10,10	122,2*. 110,3	113,4*. 102,0	102,0	+ 10,0*. ± 0,0	18,70*. 17,56	21,06	2,36*. 3,50	—	+ 26,5*. — 1,7
4,57	7,88*. 7,41	9,16	98,1*. 88,8	90,15*. 81,29	83,9	+ 7,0*. — 3,2	16,18*. 15,27	19,06	2,88*. 3,79	—	+ 16,9*. — 5,7
3,61	8,28	9,44	98,4	91,83	89,1	+ 2,9	17,06	19,63	2,57	2,4	+ 5,9
4,47	7,76	9,37	94,9	87,22	87,8	— 0,7	15,99	19,50	3,51	4,5	— 0,5
4,47	8,04	9,58	100,6	92,62	91,8	+ 0,9	16,56	19,92	3,36	4,2	+ 3,2
4,42	12,84	14,90	221,6	209,2	222,0	— 6,1	26,89	31,12	4,23	3,3	— 19,3
4,42	16,30	18,17	337,7	321,9	330,1	— 2,6	33,99	38,22	4,23	1,7	— 19,3
4,47	16,37	18,07	341,2	324,9	326,5	— 0,5	34,12	38,01	3,89	1,7	— 10,1
4,46	22,44	24,48	603,6	581,4	599,3	— 3,1	47,42	52,20	4,78	—	— 32,2

$$\sqrt{\frac{\Sigma \Delta^2}{n}} = \pm 14,4 \text{ Proz.}$$

korrigierten Leitfähigkeitswerten in den Innen- bzw. Außenflüssigkeiten vor und nach der Dialyse ausschließlich auf eine Änderung im NaCl-Gehalt zurückgeführt. Daß diese Annahme berechtigt ist, geht auch daraus hervor, daß die in einigen Fällen ausgeführten Cl-Ionenbestimmungen[1]) mit den Berechnungen aus den Leitfähigkeitsmessungen übereinstimmten. Die Differenzen zwischen den gefundenen Leitfähigkeitswerten in den Innenflüssigkeiten vor der Dialyse und den korrigierten im Gleichgewicht (Kolumne 8, Tabelle XXII) wurden vermittelst der Leitfähigkeitswerte in *Landolt-Börnsteins* Tabellen für Kochsalz in Normalität NaCl umgerechnet und von den bekannten Konzentrationswerten in den Innenflüssigkeiten vor Dialyse abgezogen. Die so erhaltenen Zahlen bezeichnen die Konzentrationen von NaCl in den Innenflüssigkeiten im Gleichgewicht (Kolumne 10, Tabelle XXII). Aus diesen wurden die entsprechenden Cl-Ionenkonzentrationen mittels der aus *Landolt-Börnsteins* Tabellen berechneten Dissoziationsgrade für NaCl ermittelt (Kolumne 2, Tabelle XXIII). Die NaCl-Konzentrationen in den Außenflüssigkeiten wurden aus den Leitfähigkeitswerten im Gleichgewicht nach Korrektion für die Leitfähigkeitswerte (Tabelle III) der jedenfalls sehr geringen Mengen Na_4-T. aus der Leitfähigkeit von Kochsalz in kohlensäurehaltiger Lösung durch graphische Interpolation erhalten und dann die Cl-Ionenkonzentrationen ausgerechnet (Kolumne 15, Tabelle XXII, und Kolumne 3, Tabelle XXIII). Nach dem Gesetz von *Donnan* würde nun

$$Cl_i [C^l + 4 C \alpha] = Cl_a^2,$$

wo Cl die Cl-Ionenkonzentrationen innen, Cl_a die außen, C die Konzentrationen von Na_4-T. und α die Dissoziationsgrade dieses Salzes bedeuten. Wie Tabelle XXIII zeigt, war diese Forderung nicht erfüllt, denn die Ionenverteilung war durch

$$Cl_i (Cl_i + C) = Cl_a^2$$

definiert. Die Genauigkeit der Bestimmungen von Cl war ja nicht überaus groß, aber die Übereinstimmung zwischen den Zahlen Kolumne 4 und Kolumne 6 ist doch unzweideutig, und zwar auch, wenn Cl_i direkt potentiometrisch bestimmt wurde (Zahlen mit *). Die Übereinstimmung wird noch besser, wenn man Rücksicht auf die S. 405 erwähnte wahrscheinliche Aggregation nimmt und statt C den Wert $0{,}78 \, . \, C$ in die Formel einsetzt (Kolumne 5).

Es muß also der Schluß gezogen werden, daß dieselbe Ionenverteilung hier zustande gekommen ist, die nach *Donnan* zu erwarten war, wenn α von der Größenordnung 0,25 bis 0,20 gewesen wäre. Die an sich zweifelhaften Werte von α (S. 399) werden hierdurch noch mehr unwahrscheinlich.

---

[1]) In Tabelle XXIII mit * bezeichnet.

In Kolumne 12, Tabelle XXIII, sind die aus der gefundenen Ionenverteilung berechneten osmotischen Drucke und in Kolumne 11 die gefundenen aufgestellt.

$$P_{\text{ber.}} = R\,T\,[C\,.\,0{,}78 - (O_a - O_i)].$$

Die gefundenen und die berechneten Werte stimmten bis zu den höheren Kochsalzkonzentrationen gut überein. Da eine Differenz von nur $1\,.\,10^{-3}$ in der Konzentration des Kochsalzes ungefähr 50 cm Wasserdruck bedeutet, und die absoluten Fehler der Bestimmungen mit steigender Konzentration des Kochsalzes größer werden, während die gefundenen Drucke bis auf einige Zentimeter abfielen, so ist es leicht zu verstehen, daß eine Übereinstimmung hier nicht gezeigt werden konnte.

Tabelle XXIV. Osmotischer Druck des Natriumsalzes der Thymonucleinsäure im Gleichgewicht mit Magnesiumchlorid.

Volumen innen / Volumen außen	Innenflüssigkeit: Normalität . 10^3 von $MgCl_2$ zugesetzt	Innenflüssigkeit: mg N auf 100 ccm	Innenflüssigkeit: $C_{Cl}\,.\,10^3$	Außenflüssigkeit: Normalität . 10^3 von $MgCl_2$ zugesetzt	Außenflüssigkeit: mg N auf 100 ccm	Außenflüssigkeit: $C_{Cl}\,.\,10^3$	Osmotischer Druck in cm Wasser gefunden
11/157	1,4	92,3	0,73	1,0	0,04	1,10	12,9
11/236	1,4	91,3	0,61	1,0	0,07	0,99	12,4
140/70	2,4	90,7	1,54	2,0	0,36	2,99	—
12/236	2,4	87,0	1,16	2,0	0,04	1,97	5,3
12/230	2,4	96,0	—	2,0	0,00	—	6,7
11/164	6,4	90,0	4,12	6,0	0,00	5,95	3,0
11/235	6,4	92,6	3,97	6,0	0,15	5,70	3,4
140/70	6,4	94,8	5,34	6,0	0,31	6,87	—
140/70	9,4	94,6	7,46	9,0	0,00	9,06	—
11/164	9,4	91,0	6,00	9,0	0,15	8,96	1,5

Tabelle XXV. Osmotischer Druck des Natriumsalzes der Thymonucleinsäure im Gleichgewicht mit Magnesiumsulfat.

Volumen innen / Volumen außen	Innenflüssigkeit: Normalität von $MgSO_4$ vor der Dialyse	Innenflüssigkeit: mg N auf 100 ccm	Außenflüssigkeit: Normalität . 10^3 von $MgSO_4$ vor der Dialyse	Außenflüssigkeit: mg N auf 100 ccm	$K_a - K_i$	Osmotischer Druck in cm Wasser gefunden
11/153	1,0	73,8	1,0	0,16	0,04	8,8
12/235	1,0	84,5	1,0	0,21	0,02	10,2
140/70	1,4	91,9	1,0	0,00	1,40	—
11/220	1,0	93,5	1,0	0,04	0,20	12,0
11/205	3,0	74,2	3,0	0,09	0,09	2,3
11/147	3,0	94,0	3,0	0,24	0,13	3,5
140/70	3,4	89,7	3,0	0,26	2,23	—
11/207	7,0	70,8	7,0	0,12	0,15	0,2
11/162	10,0	93,7	10,0	0,08	0,28	3,0
11/153	10,0	74,8	10,0	0,08	0,17	— 0,2
11/161	20,0	91,9	20,0	0,13	0,04	1,9
11/207	20,0	172,0	20,0	0,19	0,10	(— 3,5) gelatiniert
11/207	100,0	75,0	100,0	0,22	—	— 0,1 gelatiniert

Die Versuche mit Na_4-T. im Gleichgewicht mit Magnesiumchlorid und -sulfat zeigten auch eine Salzverschiebung qualitativ in Übereinstimmung mit *Donnans* Gesetz. Dies wird am besten durch die Cl-Ionenbestimmungen (Kolumnen 4 und 7, Tabelle XXIV) gezeigt. Quantitativ ließ sich hier die Ionenverteilung nach *Donnans* Formel doch nicht verfolgen, weil, wie *Donnan* gezeigt hat, eine Vertauschung der verschiedenen Kationen in solchen Systemen eintritt. Zu einer mathematischen Behandlung wären also Magnesiumionenanalysen nötig gewesen sein. Es kann aber kein Zweifel darüber herrschen, daß die Senkung des Druckes durch $MgCl_2$ und $MgSO_4$ ein Donnaneffekt war, der der Bivalenz der Mg-Ionen entsprechend viel stärker als die durch Kochsalz bedingte war.

Schlußfolgerungen.

Das Natriumsalz der Thymonucleinsäure zeigt bei neutraler Reaktion einen starken Donnaneffekt. Das Vorhandensein dieses Salzes oder anderer Verbindungen der Nucleinsäure mit diffusiblen Kationen im Zellkern muß demselben andere Eigenschaften als dem Protoplasma verleihen, indem sehr kleine Neutralsalzkonzentrationen, die auf das Protoplasma-Eiweiß in osmotischer Hinsicht keinen großen Einfluß haben können, den osmotischen Druck von Kernsubstanzen gewaltig ändern werden.

Die Ionenverschiebung durch den Donnaneffekt gibt einen Dissoziationsgrad in verdünnten Lösungen von Na_4-T. von ungefähr 0,2 an.

Abteilung VI.

Die relative innere Reibung der Nucleinsäuresalze.

Die innere Reibung der Thymonucleinsäuresalze hat aus biologischem Gesichtspunkte besonders dadurch Interesse, daß das neutrale Natriumsalz absolut und im Vergleich zu den anderen Verbindungen schon in verdünnten Lösungen eine gewaltige innere Reibung hat, die durch winzige Konzentrationen an zugesetzten Kationen sehr stark beeinflußt wird.

Das Na_4-T. hat eine außerordentlich große innere Reibung, das Ammoniumsalz schon eine geringere und die löslichen Eiweißsalze eine relativ sehr kleine. Die Reibung ist sehr empfindlich gegen Änderungen in der Wasserstoffionenkonzentration und fällt außerordentlich stark bei Zusatz von Spuren anderer Neutralsalze. Außerdem kann schon eine ziemlich verdünnte (1 proz.) Lösung von Na_4-T. leicht eine reversible Gelatinierung durchmachen. Diese Gelatinierung kann sogar bei Zimmertemperatur und neutraler Reaktion durch Dialyse einer Nucleinsäureverbindung gegen Kochsalz auftreten, wobei durch doppelte Umsetzung das Na_4-T. gebildet wird (S. 458). Die verschiedenen Nuclein-

säureverbindungen, die in der Zelle wohl vorkommen können, Eiweiß-, Natrium-, vielleicht Ammonium- und Aminosäuresalze sind durch kolossale Unterschiede in der inneren Reibung gekennzeichnet und auch gegen Änderungen in der Konzentration an Wasserstoffionen und anderen Kationen äußerst empfindlich. Osmotischer Druck und Hydratationsgrad, Zustände, die für die Wasserverteilung, die Heterogenität der Zelle, bestimmend sind, müssen also im Zellkern in hohem Grade von den Konzentrationen der Wasserstoffionen und der anderen diffusiblen Ionen abhängig sein. Denn die untersuchten Prototypen der Nucleinsäureverbindungen, von denen jedenfalls die Eiweißsalze und auch Natriumsalze, wie später gezeigt werden soll, im Zellkern wahrscheinlich vorkommen, geben bei sehr kleinen Änderungen in Art und Konzentration an diffusiblen Ionen gewaltige Variationen in dem osmotischen Drucke (S. 418). Die Variationen in dem Hydratationsgrade sind vielleicht noch mehr auffällig. Das neutrale Natriumsalz der Thymonucleinsäure hat, wie gesagt, eine außerordentlich große und variable innere Reibung. Das Vorkommen dieses Salzes im Zellkern müßte demselben also sehr charakteristische Eigenschaften im Vergleich mit dem Protoplasma verleihen.

Eine einfache Überlegung, die experimentell gestützt werden kann (S. 458), zeigt nun, daß dieses Natriumsalz höchstwahrscheinlich im Zellkern vorkommen muß, oder in jedem Falle Doppelsalze der Nucleinsäure mit Eiweiß und Natrium. Denn die Eiweißkörper der meisten Zellkerne haben eine isoelektrische Reaktion ziemlich weit von der neutralen Reaktion, und wenn man im Zellkern nicht stark saure Reaktion annehmen will, so folgt daraus, daß die Nucleinsäure als neutrales oder fast neutrales Salz vorkommen muß. Ein Eiweißstoff mit einer isoelektrischen Reaktion bei z. B. $p_H = 5$ kann nun erst bei stark saurer Reaktion und einem sehr großen Überschuß an Eiweiß (S. 450) in nennenswertem Grade in Salzbindung mit der Nucleinsäure treten. Eine Salzbindung mit „neutralem" Eiweiß (isoel. P. bei $p_H = 4{,}8$) unter Ausfällung (sogenannter Nucleoproteide) kann unter den günstigsten Umständen erst bei $p_H = 3$ bis 4,5 geschehen (s. Tabelle XLI). Wenn keine basischen Eiweißstoffe vorliegen (Histon, Protamin) oder basische Peptide und Aminosäuren, und wenn man nicht so stark saure Reaktion im Zellkern annehmen will wie in der Nähe von $p_H = 4$, ist es demnach notwendig anzunehmen, daß die Nucleinsäure vorzugsweise in Salzbindung mit stärkeren Basen vorkommt, wie den Alkalien oder Erdalkalien. In keiner Weise befremdend scheint hier doch der Gedanke zu sein, daß im Zellkern vorübergehend eine stärker saure Reaktion vielleicht lokal entstehen könnte, woraus katastrophale Änderungen in der Viskosität (s. Tabelle XXVII), sogar Ausfällungen von Nucleoproteiden

erfolgen könnten. Ich habe auch eine experimentelle Stütze für das mögliche Vorkommen von neutralen Metall-Nucleinsäuresalzen in den Zellkernen in dem Verhalten gefunden, daß Eiweiß- (18) oder Aminosäuresalze (S. 458) der Nucleinsäuren bei Dialyse in kochsalzhaltiger Lösung unter doppelter Umsetzung derart zersetzt wurden, daß die neutralen Natriumsalze der Nucleinsäuren und die Chlorwasserstoffverbindungen der Eiweißstoffe oder Aminosäuren gebildet wurden. Diese Umsetzung kann schon bei minimalen Kochsalzkonzentrationen geschehen, wenn das eine der gebildeten Salze durch die Dialysemembran diffusibel ist (s. Tabelle XLIII). Eine solche Umsetzung wurde für die neutralen Salze zwischen Nucleinsäuren und basischen Eiweißstoffen oder Aminosäuren gezeigt. Auch für saure Mischungen von neutralen Eiweißstoffen und Na_4-T., wo eine unvollständige Salzbildung vorhanden war, konnte ich durch Viskositätsmessungen eine solche Umsetzung bei höheren Kochsalzkonzentrationen wahrscheinlich machen. Diese Versuche zeigten also, daß, wenn in einem Nucleinsäuresalz entweder das Kat- oder Anion durch eine begrenzende Zellschicht diffusibel ist, diese Verbindung durch minimale Konzentrationen der im Zellkern zu verschiedenen Zeiten wohl sicher vorkommenden diffusiblen Neutralsalze gespalten werden kann. Hierbei wird das Kation des einwirkenden Neutralsalzes in Verbindung mit der Nucleinsäure treten.

Infolge des Überwiegens der Natriumsalze unter den Neutralsalzen in den Zellsäften kann mit Wahrscheinlichkeit angenommen werden, daß die Verbindung der Nucleinsäuren mit Natrium allgemein in den Zellkernen neben den Salzen mit anderen reinen Basen und Ampholyten vorkommen.

Diese Verhältnisse werden später (Abteilung VII) näher besprochen werden. Ich habe sie aber schon in diesem Zusammenhange erwähnt, eben um das biologische Interesse hervorzuheben, das sich mit den Eigenschaften des Natriumsalzes der Thymonucleinsäure verknüpft.

Die Lösungen, Tabelle XXVI, wurden aus zu verschiedener Zeit bereiteten Stammlösungen von Na_4-T. gemacht. Alle Lösungen hatten dieselbe Konzentration an Na_4-T. (0,0016 mol.). Sie wurden in genau derselben Weise aus den Stammlösungen durch Verdünnung mit Salzlösungen bereitet und dann 5 Stunden geschüttelt. Die Messungen der relativen inneren Reibung wurden alle in derselben Zeit nach der Bereitung der Stammlösung ausgeführt (5 Stunden). Aus Tabelle XXVI und Abb. 12 geht hervor, daß die Senkung der inneren Reibung durch Neutralsalze außerordentlich groß war und, in absoluten Zahlen ausgedrückt, bei weitem die gleichartige Salzwirkung auf saure oder alkalische Eiweißsalze übertraf. Daß wir es aber mit einer Ionenwirkung zu tun haben, die auch, prozentisch ausgedrückt, von einer

Tabelle XXVI. Relative innere Reibung des Natriumsalzes der Thymonucleinsäure in salzhaltiger Lösung.

N.10^3 des zugesetzten Salzes	st/s_1t_1 NaCl	st/s_1t_1 KCl	st/s_1t_1 K_2SO_4	st/s_1t_1 $MgSO_4$		st/s_1t_1 La $(No_3)_3$
0,0	11,15	12,4	12,4	12,3	—	12,3
0,5	8,5	—	—	—	—	—
1,0	7,87	—	—	7,90	—	7,95
2,0	7,05	6,6	6,5	6,32	6,33	6,02
3,0	6,34	—	—	5,42	—	5,05
3,5	—	6,1	6,0	—	5,16	—
4,0	5,87	—	—	4,85	—	—
5,0	5,53	5,7	5,6	4,72	4,73	—
6,0	5,5	5,5	5,4	4,71	4,81	—
7,0	5,40	—	—	—	—	—
8,0	5,41	5,2	5,2	4,82	4,86	—
9,0	5,17	—	—	4,88	—	—
10,0	5,12	5,1	5,1	—	4,96	—
12,0	5,00	—	—	5,01	—	—
14,0	4,91	—	—	—	—	—
16,0	4,85	—	—	5,06	—	—
18,0	4,84	—	—	—	—	—
20,0	4,80	4,7	4,7	—	5,30	—
40,0	4,5	4,6	4,6	—	—	—
61,0	—	4,6	4,6	—	—	—
100,0	4,4	—	—	—	—	—
500,0	5,0	—	—	—	—	—
1000,0	5,4	—	—	—	—	—

ganz anderen Größenordnung war als die auf Eiweißsalze, geht daraus hervor, daß schon n/2000 Kochsalz die innere Reibung um 23 Proz. herabsetzte, eine Wirkung, die keine saure oder alkalische Eiweißsalzlösung erfahren würde. Hiermit zu vergleichen sind entsprechende Zahlen von *Loeb* für Gelatinelösungen. In einer 0,8proz. Lösung von Gelatinechlorid bei $p_H = 3,0$ wurde eine Senkung durch $5 . 10^{-4}$n Kochsalz von ein bis zwei Zehnteln (um ungefähr 5 Proz.) erhalten.

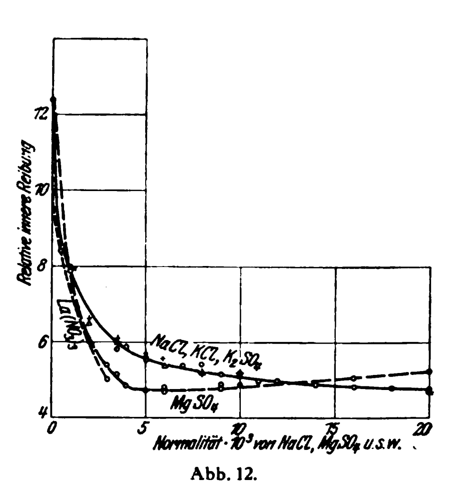


Abb. 12.

Die Senkung der relativen inneren Reibung war offenbar eine Wirkung des Ions mit entgegengesetzter Ladung zum Nucleinsäureion, also des Kations in dem zugesetzten Neutralsalz, denn KCl und K_2SO_4 hatten dieselbe Wirkung (Abb. 12). Der Effekt des Kations wurde

durch seine Valenz bestimmt, indem zweiwertige ungleich stärker als einwertige, dreiwertige als zweiwertige wirkten. Kalium- und Natriumionen hatten dieselbe Wirkung. Die dreiwertigen Kationen wirkten in Konzentrationen höher als $3 \cdot 10^{-3}$ Äquivalent-N bei der Konzentration von Na_4-T. = 0,0016 Mol. fällend. So fällten Lanthannitrat und Ferrisulfat bei $4 \cdot 10^{-3}$ Äquivalent-N, während Ferrosulfat erst bei Sättigung eine unbedeutende Fällung hervorrief. Dagegen waren Verschiedenheiten in Valenz und Art der untersuchten Anionen ohne Bedeutung.

Die Resultate stimmen also in der Hinsicht mit *J. Loebs* Resultaten an Eiweißsalzen überein, daß die Valenz, aber nicht die chemischen Eigenschaften der untersuchten Ionen für die Unterschiede im Senkungseffekt verantwortlich war, und darin, daß das Ion mit entgegengesetzter Ladung zum Kolloidion das wirksame war.

Tabelle XXVII.

Wasserstoffionenkonzentration und relative innere Reibung nach Zusatz von Salzsäure und Natriumchlorid. (Natriumsalz der Thymonucleinsäure.)

Molare Konzentration . 10^3 des neutralen Natriumsalzes der Thymonucleinsäure	Äquiv. HCl	st/s_1t_1	p_H	Molare Konzentration . 10^3 des Na-Salzes der Thymonucleinsäure	st/s_1t_1 mit Salz	st/s_1t_1 ohne Salz
1,6	0/8	5,02	6,45 6,58	1,6	—	10,1
1,6	0,5/8	—	5,14	—	—	—
1,6	1/8	3,66	4,74	—	—	—
1,6	2/8	2,61	4,30	1,2	3,90	7,22
1,6	3/8	1,80	3,98 3,81	1,0	3,36	5,95
1,6	4/8	1,40	3,55 3,54	0,8	2,90	4,23
1,6	5/8	1,30	3,23	0,6	2,28	3,3
1,6	6/8	1,28	2,97	0,4	1,81	2,41
1,6	7/8	1,22	2,87	0,2	1,40	1,57
1,6	8/8	1,18	2,73 2,73	0,0	1,00	—
1,6	9,4/8	1,16	2,52	—	—	—

Die Tabelle XXVII und Abb. 13 zeigen den Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die innere Reibung. In den Versuchen Tabelle XXVII, Kolumnen 1 bis 4, war die Konzentration an Na_4-T. konstant und gleich 0,0016 mol. Kolumne 2 enthält die Zahlen der Äquivalente von zugesetzter Salzsäure. Kolumne 3 die relative innere Reibung und Kolumne 4 die gemessenen p_H-Werte. In einigen Fällen wurden zu verschiedenen Zeiten doppelte Versuche gemacht. Alle Lösungen wurden auf dieselbe Konzentration an NaCl gebracht

(0,0064 n), wobei mit dem bei vollständiger Umsetzung zwischen HCl und Na_4-T. gebildeten Kochsalz gerechnet wurde. In Kolumnen 5, 6 und 7 sind einige Versuche wiedergegeben, die mit Na_4-T. gemacht wurden, wobei die Konzentrationen so gewählt wurden, daß die Natriumgehalte in der Nucleinsäurebindung denjenigen der gebildeten sauren Natriumsalze in den Salzsäureversuchen entsprachen, wenn vollständige Umsetzung vorausgesetzt wurde. Kolumne 7 zeigt die Resultate der Viskositätsmessungen bei diesen Konzentrationen ohne, Kolumne 6 mit Kochsalz in derselben Konzentration wie in den Salzsäureversuchen (0,0064 n). Abb. 13 zeigt, wie die relative innere Reibung bei Salzsäurezusatz außerordentlich rasch abfiel, um beinahe den relativen Wert 1 für Wasser bei einem Salzsäurezusatz zu erreichen, der gegen zwei Natriumatome in Na_4-T. äquivalent war. Von hier ab fiel die relative innere Reibung bei Zusatz von mehr Salzsäure sehr wenig. Im Wendepunkt der Kurve war der entsprechende p_H-Wert = 3,5, wo nach Abb. 2 die Dissoziation im dritten und vierten Stadium zurückgedrängt ist, und man kann wohl hier bei der Kleinigkeit der zwei letzten Dissoziationskonstanten der Nucleinsäure ohne weiteres annehmen, daß die Umsetzung praktisch vollständig war. Jedenfalls bei Gegenwart von Kochsalz müssen es also die zwei schwächsten Phosphorsäureradikalen sein, die für die große Reibung des Na_4-T. verantwortlich sind. Die zugehörige p_H-Kurve bietet nichts Unerwartetes. Die beiden gestrichelten Kurven (aus den Werten Kolumnen 6 und 7) zeigen trotz bedeutend geringerer Konzentrationen (als Nucleinsäure berechnet) bedeutend höhere Viskositätswerte als die Salzsäurekurve und einen fast linearen Verlauf. Die Kochsalzkurve (Kolumne 6) zeigte bei einem Abszissenwert 4/8 doppelt so hohe innere Reibung als die Salzsäurekurve, wo doch die Konzentration an Nucleinsäure die doppelte war. Beim Absturz der relativen inneren Reibung in dem Bereiche von p_H etwa 5 bis p_H etwa 4 behielt die Lösung ihr wasserklares Aussehen, wurde aber bei höheren Wasserstoffionenkonzentrationen immer mehr

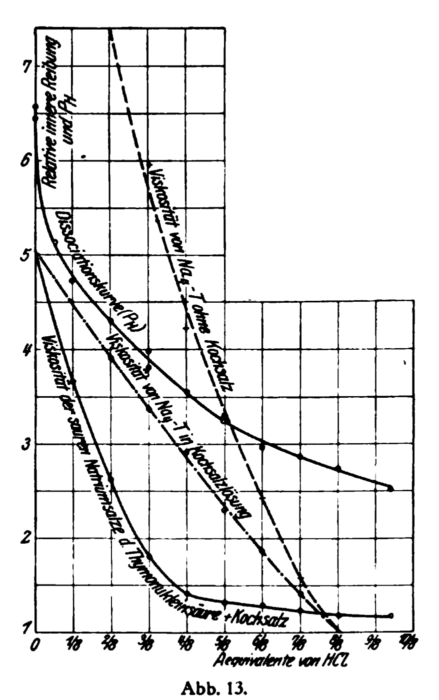


Abb. 13.

opaleszent, um schließlich ein milchiges Aussehen zu bekommen. Dementsprechend kann man bei höheren p_H-Werten als 4 keine ultramikroskopische, bewegliche Partikeln sehen, während solche in den opaleszenten Lösungen mit steigenden Wasserstoffionenkonzentrationen reichlicher auftreten. Die Unsichtbarkeit der Partikeln in den hochviskösen Lösungen beruht wohl am wahrscheinlichsten auf dem großen Hydratationsgrad. Mit der Verminderung des Hydratationsgrades zum Sichtbarwerden der ultramikroskopischen Partikeln bekam die Lösung die Eigenschaften eines Suspensionskolloids und wurde nunmehr sogar von einwertigen Kationen ausgefällt. Die Ausflockung einer Wasserlösung der freien Thymonucleinsäure mit Kochsalz erfolgte jedoch erst bei Sättigung mit diesem Salze, während eine totale Ausfällung schon durch weniger als 0,02 äquivalenten $MgCl_2$ bewirkt wurde (Tabelle XXVIII).

Tabelle XXVIII.

Ausflockung der Thymonucleinsäure mit Magnesiumchlorid.

Nr.	$MgCl_2$ Normalität . 10^3	Trommelteile (1 mm Kammer)		
		$MgCl_2$ I	Nucleinsäurelösung + $MgCl_2$ II	II — I
1	0,0	—	78	78
2	1,2	4	82	78
3	2,4	9	91	82
4	4,8	24	103	79
5	9,6	44	124	80
6	19,0	89	103	14

Die Lösungen Tabelle XXVIII wurden ungefähr eine Stunde nach der Bereitung im Interferometer untersucht. Die Zahlen, Kolumne 5, zeigen, daß eine Ausflockung sich im Interferometer erst zwischen 0,01 und 0,02 Normalität des $MgCl_2$ bemerkbar machte. Wurde die freie Thymonucleinsäure mit $MgCl_2$ ausgefällt, ging die Fällung bei Waschung mit Wasser wieder in kolloide Lösung.

Die Wasserlösungen des a-Salzes der Thymonucleinsäure, nach *Neumanns* Methode hergestellt (12), besitzen bekanntlich die Eigentümlichkeit, unter gewissen Umständen zu versteifen. Die bisherigen Darstellungsmethoden gehen alle darauf aus, die Thymusdrüse mit Natronlauge mehr oder weniger intensiv zu behandeln, um die Nucleinsäure vom Eiweiß zu befreien. Das so gewonnene Natriumsalz, a-thymonucleinsaures Natrium genannt, ist in Wasser löslich, aber die mindestens 5proz. Lösung versteift in Kälte zu einer Gallerte. Wird das a-Salz in Lösung mit Natronlauge oder trocken (32) erhitzt, so erfolgt eine Umwandlung, wobei die nicht gelatinierende b-Form gebildet wird. Es scheint somit, als ob längere Erhitzung der Thymonucleinsäure mit Natronlauge für die Unversehrtheit der Säure nicht ohne Bedeutung

sei, und es liegt nahe zu vermuten, daß auch eine ziemlich milde Behandlung der Thymonucleinsäure mit Alkali eine Umwandlung der nativen Nucleinsäure geben könnte. *Feulgen* (10) hat ein Natriumsalz der Thymonucleinsäure nach kurzdauernder Alkalieinwirkung in der Hitze hergestellt, kommt aber zu folgendem Schluß (33): „Aus diesen Versuchen geht wiederum hervor, daß die Darstellung von wirklich unzersetztem a-nucleinsauren Natrium zurzeit technisch unmöglich ist".

Bei der von mir benutzten, modifizierten Methode von *I. Bang* (S. 386) wurden alle Präparationen bei gegen Lackmus neutraler Reaktion ausgeführt, und das dabei erhaltene Natriumsalz der Thymonucleinsäure (Na_4-T.) hatte in mehreren Hinsichten andere Eigenschaften als die mit Alkali behandelten Präparate. Jenes Natriumsalz löste sich langsam, ohne Erwärmung in Wasser, wobei die fadenförmige Substanz zuerst enorm stark aufquoll und glasig, durchsichtig wurde. Eine 0,2proz. Lösung hatte eine relative innere Reibung von ungefähr 10 bis 12 (Wasser = 1), und eine 4 bis 5proz. Lösung bildete eine dicke Masse. Diese Masse hatte jedoch nicht die feste Beschaffenheit einer erstarrten 5proz. Lösung des a-Salzes. Die Verschiedenheit war auch im Ultramikroskop zu sehen. Die dicke 5proz. Lösung vom Na_4-T. zeigte nämlich keine Partikeln, die Gallerte vom a-Salz dagegen bestand aus grauen, leuchtenden Massen, die aus dicht gelagerten Körnchen zusammengesetzt waren. Wenn aber eine 1proz. oder stärkere Lösung von Na_4-T. mit ein wenig Natronlauge eine Minute im Wasserbade erhitzt wurde, erstarrte nach Neutralisation mit Salzsäure in der Kälte die ganze Flüssigkeit zu einer Gallerte mit demselben Aussehen im Ultramikroskop wie die gelatinierte Lösung des a-Salzes.

In Tabelle XXIX sind einige Resultate von Versuchen über Alkaliwirkung auf Na_4-T. zusammengestellt.

Tabelle XXIX.

Titrierung mit HCl und Phenolphthalein nach Erwärmung des Natriumsalzes der Thymonucleinsäure mit Natronlauge.

Nr.	Molare Konzentration Na_4-T.	Zugesetzte Natronlauge in ccm	Normalität NaOH berechnet	Zeit der Erwärmung in Minuten	Verbrauchte Salzsäure in ccm	Gallertbildung
1	0,012	0,00	0,00	0	0	Flüssig
2	0,012	1,70 n/5	0,033	0	1,68 n/5	+
3	0,012	1,79 n/5	0,033	1	1,74 n/5	+
4	0,012	1,90 n/5	0,033	10	1,85 n/5	+
5	0,014	2,5 n/1	0,1	60	2,48 n/1	+++
6	0,012	5,0 n/1	0,2	60	5,01 n/1	+++
7	0,012	10,0 n/1	0,4	60	9,92 n/1	Flüssig
8	0,012	15,0 n/1	0,6	60	14,99 n/1	„

+ = lose Gallertbildung.
+++ = feste Gallertbildung.

Versuch 2 zeigt, daß eine schwache Alkalikonzentration schon bei Zimmertemperatur imstande war, eine Gallertbildung hervorzurufen. Versuche 7 und 8 zeigen, daß stundenlanges Erhitzen mit starker Natronlauge nach Neutralisation keine Gallertbildung gab, wahrscheinlich, weil hier das durch eine Hydrolyse gebildete a-Salz weiter in das b-Salz umgewandelt worden war.

Eine Gallertbildung konnte auch leicht durch Erwärmung einer 1proz. oder stärkeren Lösung von Na_4-T. mit sehr wenig Natriumacetat erhalten werden. Zu bemerken ist doch, daß Natriumacetat, auch in großen Konzentrationen, bei Zimmertemperatur keine Spur von Gallertbildung hervorrief.

Wahrscheinlich enthalten die a-Salze, wenigstens dasjenige nach *Neumann*, wechselnde Mengen nicht gelatinierendes b-Salz (32). Mein Präparat zeigte ja nun gar kein Gelatiniervermögen, aber dies kann selbstverständlich nicht auf einem Gehalt an b-Salz beruhen, denn eben durch schwache Alkalieinwirkung trat ein Gelatiniervermögen sogar in 1proz. Lösungen auf.

Nach einer Untersuchung von *Feulgen* (10) über Alkalieinwirkung auf Thymonucleinsäure gehen dabei 2 Atome Natrium in 1 Molekül der Nucleinsäure hinein unter Bildung einer nicht gelatinierenden, völlig inaktiven, in Wasserlösung stark hydrolysierten Verbindung. Es war nun von großem Interesse zu wissen, ob diese inaktive Verbindung mit Natrium bei Na_4-T. schon bei Zimmertemperatur gebildet wurde oder erst bei höherer Temperatur. Im letzteren Falle jedenfalls müßte man annehmen, daß Bindungen von Esternatur bei Bildung von a-Salz aufgelöst werden. Die Tabelle XXX zeigt, daß die Wasserstoffionenkonzentrationen in alkalischen Lösungen von Na_4-T. bei Erwärmung stiegen.

Tabelle XXX. Die Hydroxylionenkonzentration in Lösungen von Na_4-T. vor und nach Erwärmung mit Natronlauge.

Nr.	Molare Konzentration von Na_4-T.	Normalität der zugesetzten Natronlauge	c_H gefunden bei 16°	
			vor Erwärmung	nach Erwärmung
1	0,012	0,000	$1{,}02 \cdot 10^{-7}$	—
2	0,012	0,002	$3{,}82 \cdot 10^{-12}$	$10{,}60 \cdot 10^{-12}$
3	0,012	0,100	$2{,}06 \cdot 10^{-13}$	$3{,}01 \cdot 10^{-13}$
4	0,005	0,001	$6{,}5 \cdot 10^{-12}$	$30{,}0 \cdot 10^{-12}$

Nr.	c_{OH} berechnet aus K_w		I — II	Konzentration der durch Hydrolyse verschwundenen OH-Ionen
	vor Erwärmung I	nach Erwärmung II		
1	$0{,}608 \cdot 10^{-7}$	—	—	—
2	$16{,}2 \cdot 10^{-4}$	$5{,}85 \cdot 10^{-4}$	$1{,}04 \cdot 10^{-3}$	$1{,}06 \cdot 10^{-3}$
3	$(3{,}01 \cdot 10^{-2})$	$(2{,}06 \cdot 10^{-2})$	$(0{,}95 \cdot 10^{-2})$	$(6{,}90 \cdot 10^{-2})$
4	$9{,}54 \cdot 10^{-4}$	$2{,}07 \cdot 10^{-4}$	$7{,}47 \cdot 10^{-4}$	$6{,}43 \cdot 10^{-4}$

Die Messungen der nicht erwärmten und der erwärmten Proben geschahen gleichzeitig. Die Bereitung der Lösungen, die Erwärmung und Überführung in die Meßelektroden wurden in mit Natronkalk gegen die Luft abgeschlossenem System ausgeführt. Versuche hatten gezeigt, daß 0,0003 g-Mol. NaOH nötig waren, um 0,01 g-Mol. Na_4-T. in Wasserlösung eine $C_H = 0{,}79 \cdot 10^{-7}$ zu geben. Bei der Konzentration 0,012 (Kolumne 2, Tabelle XXX) würden also die C_{OH}-Werte mit $0{,}36 \cdot 10^{-3}$ n durch saure Affinitäten des Na_4-T. gesenkt. (Für $5 \cdot 10^{-3}$ m an Na_4-T. berechnet sich dieser Wert zu $0{,}15 \cdot 10^{-3}$ n.) Werden die aus den zugesetzten Mengen Natronlauge (Kolumne 3) berechneten C_{OH}-Werte mit $0{,}36 \cdot 10^{-3}$ bzw. $0{,}15 \cdot 10^{-3}$ vermindert und von den so erhaltenen Zahlen die Werte von C_{OH} nach Erwärmung abgezogen, erhält man die Konzentrationen der durch Hydrolyse verschwundenen Hydroxylionen (Kolumne 9). Versuche 2 und 4 zeigten, daß 50 bis 60 Proz. von den zugesetzten Hydroxylionen während der Erwärmung verschwanden. Während der Messungen von C_H hatte in diesen beiden Versuchen offenbar keine Hydrolyse stattgefunden, denn die Zahlen Kolumne 8 stimmen gut mit denen in Kolumne 9 überein. In Versuch 3 war es natürlich nicht möglich, die C_{OH} aus den äußerst kleinen Differenzen in C_H vor und nach Erwärmung sicher zu berechnen. So viel läßt sich aber sagen, daß in Versuch 3 mehr als $1 \cdot 10^{-3}$ OH-Ionen durch Hydrolyse verschwunden waren, und daß ein Teil der Hydrolyse schon bei Zimmertemperatur eingesetzt hatte. Aus diesen Versuchen geht also hervor, daß in der unzersetzten Thymonucleinsäure bei Behandlung mit Natronlauge esterartige Bindungen aufgelöst wurden. Allerdings müssen die hierbei freigemachten sauren Gruppen äußerst schwach sein, wie *Feulgen* schon gezeigt hat, denn durch Zurücktitrierung mit Salzsäure (Phenolphthalein) konnten sie nicht nachgewiesen werden (Tabelle XXIX). Aus *Feulgens* Versuchen geht auch hervor, daß die optische Inaktivierung in alkalischer Lösung und Reaktivierung bei neutraler Reaktion nicht direkt von dem Dissoziationszustande dieser Gruppen abhängig ist, sondern auf irgend einer inneren reversiblen Umlagerung in den Kohlehydratgruppen beruht, die auch durch Säurewirkung eintritt. Nun hatte das nicht mit Natronlauge behandelte Na_4-T. sogar in verdünnter Lösung eine spezifische Rotation, die größer war (120) als die von *Feulgen* für 10proz. a-Salz gefundene (80) (Tabelle XXXI, Versuche 1 und 2). Der Gehalt an Na_4-T. wurde aus dem Stickstoffgehalt der Lösungen berechnet, wobei der prozentische Stickstoffgehalt in Präparaten, die im Vakuum bei 90° getrocknet wurden, der Berechnung zugrunde lag.

Aus dieser Tabelle geht hervor, daß man nach Alkalibehandlung in der Hitze und Neutralisation nicht diese starke Rotation zurückbekommt. sondern eine erheblich niedrigere (Versuche 9 und 10), und

Tabelle XXXI.
Spezifisches Rotationsvermögen von Na_4-T. in neutraler und alkalischer Lösung.

Nr.	g Na_4-T. auf 100 ccm	Normalität d. zugesetzt. Natronlauge	Zeit der Erwärmung in Minuten	Neutralisierung mit HCl vor der Messung von [α]	[α] in Graden	$[\alpha]_D^{20^\circ}$	
1	2,00	0,0	0	—	2,39	119,5	120,1
2	1,40	0,0	0	—	1,69	120,7	
3	10,0	0,2	0	Nicht	0,28	2,8	
4	1,66	0,01	0	„	1,516	91,3	
5	1,40	0,1	0	„	0,380	27,1	
6	1,00	0,01	0	„	0,782	78,2	
7	0,66	0,01	0	„	0,441	66,8	
8	1,40	0,1	20	„	0,00	0,00	
9	1,40	0,1	20	Neutralisiert [1])	1,26	90,0	
10	1,40	0,2	180	„ [2])	1,30	92,9	

daß die Inaktivierung in alkalischer Lösung ohne Erwärmung nicht vollständig war (Versuche 3 bis 7). Vollständige Inaktivierung wurde erst nach Erwärmung mit Natronlauge erreicht (Versuch 8). Im Gegensatz hierzu erhält *Feulgen* vollständige Inaktivierung des a-Salzes bei Zimmertemperatur und augenblicklich nach Zusatz von Natronlauge. Aus diesen und den Versuchen Tabellen XXIX und XXX muß ich schließen, daß die nicht mit Alkali behandelte Thymonucleinsäure bei Erwärmung mit Alkali in bezug auf Alkalibindungsvermögen, spezifische Rotation und Gelatinierbarkeit verändert wurde, und daß diese Veränderung durch Neutralisation nicht quantitativ reversibel war. Sehr schwach saure Affinitäten wurden dabei gebildet, die spezifische Rotation wurde erniedrigt und das Gelatiniervermögen trat hervor. Das gelatinierende a-Salz der Thymonucleinsäure muß demnach als ein Denaturierungsprodukt angesehen werden.

Auffällig ist die Leichtigkeit, mit der das Natriumsalz der Thymonucleinsäure bei doppelter Umsetzung einer Nucleinsäureverbindung mit Kochsalz bei wirklich neutraler Reaktion gelatinieren kann. Wurde z. B. das neutrale Salz von Lysin mit Thymonucleinsäure gegen Kochsalzlösung dialysiert, ging neutrales Lysinchlorid durch die Membran, und es blieb das neutrale Natriumsalz der Thymonucleinsäure auf der anderen Seite zurück (S. 458). War die Kochsalzkonzentration genügend hoch, erstarrte die Nucleinsäuresalzlösung zu einer festen Gallerte. Bei der Bereitung des Lysinsalzes der Thymonucleinsäure wurde die Säure aus dem Natriumsalz mit Salzsäure bei 0° ausgefällt, wie dies auf S. 388 beschrieben ist. Obgleich unwahrscheinlich, ist es doch denkbar, daß die Nucleinsäure hierbei eine Hydrolyse der erwähnten

[1]) Gelatiniert.
[2]) Flüssig.

Bindungen erfahren hatte und deshalb Gelatinierungsvermögen zeigte. Indessen kann man auch Gelatinierung von Na_4-T. ohne jegliche Hydrolyse bekommen, denn bei der Dialyse des Natriumsalzes der Nucleinsäure gegen Magnesiumsulfat erhält man oft feste Gallerten (in 0,7proz. Lösung von Na_4-T.). Hier muß ein Teil des Natriumsalzes durch Donnaneffekt in Magnesiumsalz umgewandelt worden sein. Sogar die sauren Natriumsalze der Thymonucleinsäure, die sehr wenig hydratisiert waren, zeigten unter Umständen Gallertbildung. Eine Lösung eines sauren Natriumsalzes ($p_H = 2,8$) wurde in der Weise bereitet, daß die freie Säure mit Wasser geschüttelt und dann Natronlauge tropfenweise zugesetzt wurde unter Achtgeben darauf, daß die Reaktion nie alkalisch war. Die neutrale Flüssigkeit wurde aufs neue geschüttelt und die gelöste Nucleinsäure wie vorher vorsichtig neutralisiert. Es gelang so, das zweifach saure Salz in Lösung zu bekommen, ohne daß die ungelöste Nucleinsäure in Berührung mit der Natronlauge kam. Die saure, dünne Lösung verwandelte sich in einer Stunde unter Auspressung von „Serum" in erbsengroße, durchsichtige Klumpen aus agglutinierten kolloiden Partikeln (sichtbar im Ultramikroskop). Es gibt offenbar mehrere äußere Momente, die Gallertbildung hervorrufen können, was ja nicht ausschließt, daß das Phänomen, wie *Feulgen* annimmt (10), durch eine und dieselbe Umlagerung im Molekül der Nucleinsäure verursacht sein kann. Von besonderem Interesse ist die Gallertbildung von biologischem Gesichtspunkte aus, denn die formbildenden Eigenschaften werden dadurch stark beeinflußt. Im Kardioidultramikroskop boten alle gelatinierte Lösungen von Na_4-T. sehr charakteristische Bilder dar. Wurde ein Stückchen der Gallerte in eine Quarzkammer gepreßt, konnte man stark glänzende graublaue Massen sehen, die ganz deutliche körnige Struktur hatten. Die Massen waren von dunklen Spalten durchsetzt und in diesen tanzten mehrere kolloide Partikeln. Setzte man ein wenig Wasser zu, vermehrten sich diese, und ich konnte mehrmals sehen, wie größere Häufchen an den Rändern der körnigen Massen zu schaukeln begannen, um sich bald loszureißen, wonach sie plötzlich in einzelne Partikeln zersprengt wurden. Wurde eine hinreichende Menge Wasser zugesetzt, verschwanden nach einiger Zeit alle sichtbaren Partikeln, wahrscheinlich wohl, weil sie sich rehydratisierten. Eine 2proz. Lösung von Na_4-T. in Wasser wurde mit ein wenig Natriumacetat versetzt und dann zwei gleich große Proben abgewogen. Die eine wurde 3 Minuten lang im siedenden Wasserbade erhitzt und erstarrte beim Abkühlen zu einer Gallerte. Beide Proben wurden nun mit Wasser ausgerührt und auf 100 ccm verdünnt. Nachdem sie über Nacht gestanden hatten, wurde die relative innere Reibung der klaren Lösungen gemessen. Gefunden für die nicht gewärmte Lösung: 3,654, für die gewärmte: 2,515. Die

aufgelöste Gallerte wurde also in etwa 15 Stunden nicht vollständig rehydratisiert.

Die Leichtigkeit, mit welcher eine Phasenumkehr in den Natriumsalzen der Thymonucleinsäure eintrat, wobei formbildende Eigenschaften zutage kamen, suggeriert den Gedanken, daß ein solcher Prozeß im Zellkern die Konsistenz und die Form von den festeren Bildungen geben könnte. In diesem Zusammenhange muß ich an die Gesichtspunkte erinnern, die von *Paolo D. Valle* (34) angeführt worden sind. Er nimmt unter anderem an, daß die Chromosomen durch Assoziation von dispersen Partikeln zustande kommen, und sagt weiter: „Was das Verschwinden der Chromosomen anbetrifft, so zeigt eine objektive Analyse, daß es viel angezeigter ist, statt von einem Ausstrecken von Pseudopodien, von einer fortschreitenden Aufquellung und schließlichen Lösung zu sprechen. Diese Erscheinung ist vollkommen identisch mit der Lösung eines zylindrischen Gelatinestückes in lauem Wasser, und zwar auch hinsichtlich der zunehmenden Verlangsamung des Phänomens.“

Ich möchte hiermit nur hervorheben, daß die reversible Gallertbildung als ein hypothetischer Faktor im Zustandekommen der wechselnden Heterogenität im Zellkern betrachtet werden kann.

Alle Eingriffe, die eine Gallertbildung verursachten, waren solche, die den Hydratationsgrad von Na_4-T. verminderten. Die Gallertbildung von Na_4-T. kam in letzter Hand dadurch zustande, daß die Partikeln des dehydratisierten Salzes agglutinierten und, wie die ultramikroskopische Beobachtung lehrte, wahrscheinlich eine zusammenhängende geschlossene Phase bildeten. Wahrscheinlich ist ein gewisses Verhältnis zwischen Konzentration und Hydratationsgrad notwendig, um die Bedingungen einer Gallertbildung zu geben.

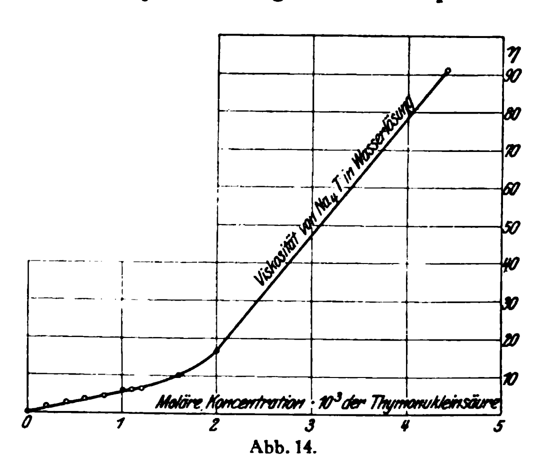


Abb. 14.

Es scheint auch sehr plausibel zu sein, daß die Rehydratation in einer warmen, dünnflüssigen Na_4-T.-Lösung beim Abkühlen so langsam eintritt, daß die festen Partikeln Zeit haben, sich zu einer zusammenhängenden Phase zu vereinigen. Die sehr langsame Auflösung und Rehydratation einer Na_4-T.-Gallerte spricht entschieden zugunsten dieser Möglich-

keit. Um einen besseren Einblick in den Mechanismus dieser Gallertbildung zu gewinnen, wäre es aber wünschenswert, wenigstens approximativ das absolute Volumen der dispersen Phase in verschieden konzentrierten Lösungen von Na_4-T. zu kennen. Die relative innere Reibung von Na_4-T. in Wasserlösung ist nun, wie die Abb. 14 lehrt, nur bei sehr niedrigen Konzentrationen eine lineare Funktion der Konzentration.

Wie *Hatschek* (35) gezeigt hat, kann man für den Teil der Viskositätskurve, der steiler ansteigt, die Abhängigkeit der Reibung von der Konzentration durch den Ausdruck

$$\frac{\sqrt[3]{A}}{\sqrt[3]{A}-1},$$

wo A das Verhältnis $\frac{\text{Volumen des Systems}}{\text{Volumen der dispersen Phase}}$ und η die relative innere Reibung sind, bezeichnen. *Hatschek* nimmt an, daß bei konstanter Temperatur das Volumen der dispersen Phase ein konstantes Multipel von dem Volumen oder dem Gewicht der gelösten Substanz ist. In dem Falle müßte nach ihm das Verhältnis

$$\frac{\text{Totales Volumen}}{\text{Volumen der dispersen Phase}} : \frac{\text{Totales Volumen}}{\text{Gewicht gelöster Substanz}} = A : A_1 = k$$

sein. Wenn A aus $\left(\frac{\eta}{\eta - 1}\right)^3$ berechnet wurde, konnte *Hatschek* aus Viskositätsmessungen ein konstantes Verhältnis A_1/A erhalten unter der Voraussetzung, daß das Volumen der dispersen Phase (mit Wasser) mehr als 40 Proz. von dem totalen Volumen des Systems betrug.

Tabelle XXXII.

Volumen der dispersen Phase in Wasserlösungen von Na_4-T.

g Na_4-T. auf 100 ccm Wasser c	Relative innere Reibung η	Verhältnis: $\frac{\text{Gesamtvolumen}}{\text{Volumen disperser Phase}}$ berechnet aus $\left(\frac{\eta}{\eta-1}\right)^3$. A	Verhältnis: $\frac{\text{Gesamtvolumen}}{C}$ A_I	Quotient: $\frac{A_I}{A}$
0,284	16,77	1,203	352,1	293
0,227	10,10	1,367	440,5	322
0,171	7,22	1,564	584,8	374
0,156	6,17	1,700	641,0	377
0,142	5,95	1,737	704,2	405
0,114	4,23	2,246	877,2	391
0,085	3,30	2,954	1176,5	398
0,0568	2,41	4,993	1760,6	353
			Mittel	$364 \pm 36{,}7$

Tabelle XXXII zeigt eine derartige Berechnung von dem Verhältnis zwischen dem Volumen der dispersen Phase und der Konzentration für Lösungen von Na_4-T. Aus den Werten Kolumne 5 geht hervor, daß 1 g Na_4-T. in Wasserlösung ein Volumen von ungefähr 364 ccm hatte. Das Verhältnis A_I/A zeigte zwar ziemlich große Variationen. Die mittlere Abweichung war $\pm$ 36,7 und die prozentische mittlere Abweichung $\pm$ 10,1. Dieser Fehler ist ungefähr von derselben Größenordnung wie der in den Versuchen von *Bottazi* und *d'Errico* (36) über die Viskosität von Kaseinnatrium. Die Größe der Hydratation wäre nach diesen Berechnungen außerordentlich, denn die feste Phase, Na_4-T., würde 400 bis 500 ihr eigenes Volumen Hydratationswasser binden. Die Tabelle XXXII zeigt weiter, daß in einer ungefähr 0,3proz. Lösung die disperse Phase 80 Proz. und in einer 0,1proz. etwa 40 Proz. des Raumes ausfüllen. Dies heißt, daß in einer 0,5proz. oder stärkeren Lösung alles Wasser als Hydratationswasser gebunden sein würde. In diesem Zustande würde das Wasser die Aggregation der Partikeln verhindern können. Wird aber der Hydratationsgrad bei unveränderter Konzentration gesenkt, so würde nach dieser Vorstellungsweise eine Phasenumkehr plötzlich dadurch eintreten, daß die Lösung im Verhältnis zum Hydratationswasser mit festen Na_4-T.-Partikeln überladen wird und diese sich agglutinieren. Diese Betrachtungsweise kann das absolut konstante Auftreten von ultramikroskopisch sichtbaren agglutinierten Partikeln bei der Gallertbildung erklären. *Feulgen* (10) hat bei seinen Versuchen über den Zusammenhang zwischen optischer Aktivität, Alkalibindungsvermögen und Gallertschmelzpunkten mit einem Natriumsalz der Thymonucleinsäure gearbeitet, das schon durch Alkalibehandlung in der Wärme zersetzt war. *Feulgen* hat die Entdeckung von *Jones* (37), daß die optische Aktivität von Polynucleotiden in alkalischer Lösung vermindert wird, weiter verfolgt. Wenn er eine alkalische Lösung vom a-Salz der Thymonucleinsäure mit Alkohol fällt, bekommt er eine alkalisch reagierende, optisch inaktive Verbindung, in der er durch Titrierung zu neutraler Reaktion mit Säure das hydrolysierbare Alkali zu 2 Molekülen auf 1 Molekül Nucleinsäure bestimmt. *Feulgen* vermeint daraus den Schluß ziehen zu können, daß eben dieses Bindungsverhältnis etwas für die Thymonucleinsäure Charakteristisches sei, und erklärt, daß diese Entdeckung eine Komplikation für die Nucleinsäureforschung bedeutet, weil man bei vier Kohlehydratgruppen am wahrscheinlichsten vier saure Gruppen zu erwarten hätte, wenn die Kohlehydratmoleküle gleichsinnig gebunden wären. Obgleich nun *Feulgen* selbst gefunden hat, daß die von ihm entdeckten sauren Gruppen schwächer sind als das zweite Dissoziationsstadium der Kohlensäure (!), meint er, durch Ausfällung mit Alkohol bestimmte Schlüsse über die Zahl dieser Gruppen

ziehen zu können. Der Gehalt an hydrolysierbarem Alkali in der Fällung muß selbstverständlich je nach dem Zustande in der alkalischen Lösung vor dem Zusatz von Alkohol wechseln, und nicht einmal in dem Falle, daß maximale Salzbildung (bei sehr großem Alkaliüberschuß) vor der Fällung vorhanden wäre, kann man nach *Störung des Gleichgewichtes* aus der Zusammensetzung der Fällung quantitative Schlüsse über den Gleichgewichtszustand in der Lösung ziehen. Diese Versuche von *Feulgen* schließen also nicht die Möglichkeit aus, daß das vierwertige Natriumsalz der Thymonucleinsäure mehr als zwei weitere Natriumatome aufnehmen könnte. Daß nach *Feulgen* eine 10proz. Lösung des a-Salzes eben beim Verhältnis 2 Moleküle NaOH auf 1 Molekül Nucleinsäure inaktiviert wird, kann (wenn die Konzentration des a-Salzes nicht für die lufttrockene Verbindung angegeben ist) zugunsten *Feulgens* Annahme sprechen, kann aber ebensogut ein Zufall sein. Das letztere gewinnt sogar an Wahrscheinlichkeit durch *Feulgens* Fund, daß auch andere Eingriffe eine starke Schwächung der optischen Aktivität [Erhitzung[1]) und Säuren] verursachen. Niemand wird wohl die Richtigkeit der Annahme von *Feulgen* bestreiten, daß die Inaktivierung durch irgend eine Umlagerung im Nucleinsäuremolekül zustande kommt. Dagegen hat er in keiner Weise gezeigt, daß die Inaktivierung mit Bildung eben des sechswertigen Natriumsalzes verbunden sei.

Wie schon erwähnt ist, mußten alle Bestimmungen der Leitfähigkeit und der relativen inneren Reibung in gleicher Zeit nach der Bereitung der Lösungen gemacht werden, weil sich diese Größen mit der Zeit änderten, indem die Leitfähigkeit größer, die Reibung kleiner wurde. Dabei waren osmotischer Druck und Interferometerwerte konstant. Ich habe Kontrollversuche gemacht und die Lösungen von Na_4-T. in Geräten von reinstem Quarz aufbewahrt und die gleichen Änderungen mit der Zeit wie bei Aufbewahrung in Jenageräten bekommen.

Da ferner die Interferometerwerte (10 mm Kammer) absolut konstant waren, im Ultramikroskop keine Bakterien zu sehen waren und die Lösungen in diesen Versuchen kohlensäurefrei aufbewahrt

---

[1]) *Feulgens* Versuch über die Inaktivierung des a-Salzes durch Erhitzung der Wasserlösung ist schwierig zu beurteilen, solange man jede Angabe über die Wasserstoffionenkonzentration vermißt. Ich habe gefunden, daß Na_4-T.-Lösungen von $p_H = 6,2$ bei Erwärmung in einigen Minuten im siedenden Wasserbade nachweisbare Mengen Phosphorsäure abspalteten, wobei die Interferometerzahl, die Leitfähigkeit und Wasserstoffionenkonzentrationen anstiegen. Wenn bei $p_H = 7,2$ erhitzt, wurde dagegen kein Phosphor abgespalten. Nun gibt *Feulgen* an, daß ein von ihm benutztes a-Salz per 1 Mol. $^1/_4$ g-Mol. NaOH zu neutraler Reaktion (Lackmus?) verbrauchte. Mein Präparat verbrauchte zu $p_H = 7,10$ 0,030 g-Mol. NaOH für jedes Grammolekül Na_4-T. Ob die von *Feulgen* erhitzten Lösungen sauer waren, entzieht sich aber der Beurteilung.

wurden, kann angenommen werden, daß die gefundenen Änderungen reine Zeitänderungen waren. Bei den Viskositätsmessungen wurde jedenfalls ein wenig kohlensäurehaltige Luft in den Apparat eingesaugt. Parallelversuche, wo die Luft durch Natronkalkröhren von Kohlensäure befreit wurde, zeigten aber gleichartige Änderungen mit der Zeit, weshalb wohl jene Fehlerquelle ohne Bedeutung war. Der Observationsdauer der Zeitänderungen wurde in den meisten Fällen nur über 3 Tage ausgedehnt. Die Lösungen zu den Messungen der relativen inneren Reibung wurden in den Viskosimetern aufbewahrt. Die Leitelektroden wurden in einigen Versuchen jeden Tag mit den vorrätigen Lösungen neu gefüllt, in anderen Versuchen blieben dieselben Lösungen während der ganzen Zeit in den Elektroden. Die Einfüllungen wurden kohlensäurefrei ausgeführt.

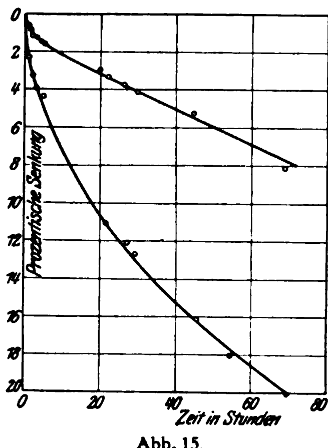


Abb. 15.

In der Tabelle XXXIII sind die Zeiten (Kolumnen 2 und 5) von 5 Stunden nach dem Aufgießen des Wassers auf das Na_4-T. gerechnet. Während dieser 5 Stunden wurden die Flüssigkeiten geschüttelt. Die Senkung Kolumnen 4 und 7 ist als die Differenz

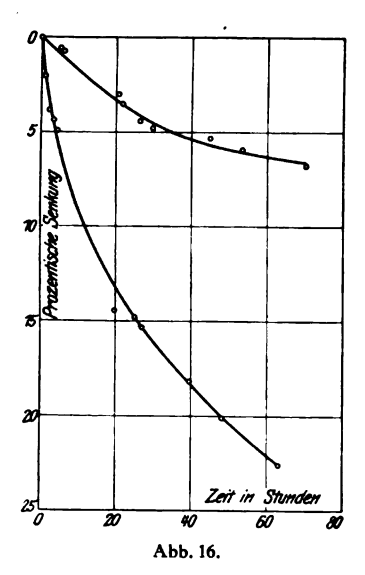


Abb. 16.

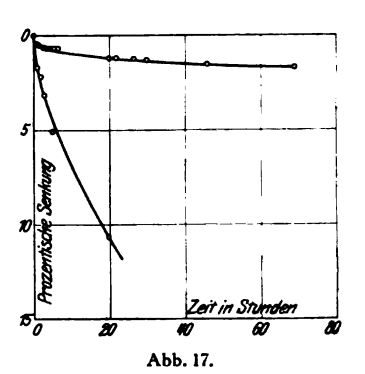


Abb. 17.

zwischen dem Anfangswerte und dem folgenden, in Prozenten vom Anfangswerte berechnet, angegeben. Die Hysteresis der Lösungen war beträchtlich und stimmte nicht mit den Altersveränderungen von Gelatine und Caseinnatrium überein. In Lösungen von Caseinnatrium

Tabelle XXXIII.

Die Senkung mit der Zeit von dem spezifischen elektrischen Widerstand und der relativen inneren Reibung beim Natriumsalz der Thymonucleinsäure.

Molare Konzentration . 10^3	Zeit in Stunden	Spezifischer elektrischer Widerstand in Ohm	Senkung	Zeit in Stunden	Relative innere Reibung	Senkung
4,4 (Abb. 15)	20,0	2213,4	—	0	91,30	—
	81,5	2200,8	0,57	1	89,02	2,50
	1,5	2195,5	0,81	2	88,65	2,90
	3,0	2185,1	1,28	3	88,06	3,55
	4,0	2185,1	1,28	5	87,62	4,03
	5,0	2178,0	1,60	21	81,47	10,77
	19,5	2148,1	2,95	27	80,57	11,75
	22,0	2139,3	3,35	29	80,05	12,32
	26,0	2130,8	3,73	35	76,51	16,20
	29,5	2122,2	4,12	54	74,77	18,10
	44,5	2105,4	4,88	69	72,86	20,2
	52,3	2098,4	5,20	—	—	—
	68,5	2033,0	8,15	—	—	—
2,0 (Abb. 16)	0	4541,3	—	0	16,77	—
	1,0	4516,8	0,54	1	16,32	2,68
	5,0	4515,0	0,58	2	16,12	3,88
	6,0	4509,1	0,71	3	16,03	4,41
	21,5	4380,1	3,55	4	15,94	4,95
	26,0	4339,7	4,44	19,5	14,35	14,43
	29,5	4322,9	4,81	25	14,29	14,79
	44,5	4300,2	5,31	27	14,20	15,32
	53,0	4269,7	5,98	39,5	13,72	18,19
	70,0	4230,2	6,85	63	12,98	22,60
1,1 (Abb. 17)	0	8210	—	0	6,17	—
	1,0	8178	0,39	1	6,07	1,62
	1,5	8175	0,43	2	6,04	2,11
	2,5	8163	0,57	3	5,98	3,08
	3,5	8163	0,57	5	5,86	5,02
	4,5	8161	0,60	20	5,52	10,53
	5,5	8159	0,62	—	—	—
	6,5	8159	0,62	—	—	—
	20,0	8117	1,13	—	—	—
	22,0	8117	1,13	—	—	—
	26,5	8112	1,19	—	—	—
	30,0	8110	1,22	—	—	—
	46,0	8093	1,43	—	—	—
	69,0	8075	1,64	—	—	—

sinkt Leitvermögen und Viskosität nach *Pauli* (38) mit der Zeit *unabhängig voneinander*. *Loeb* (5) nimmt für Gelatine, wo die Viskosität mit der Zeit steigt, eine Formierung von gequollenen Micellae an.

Die außerordentlich starke Senkung der inneren Reibung in meinen Versuchen (über 20 Proz.) muß selbstverständlich mit der hohen Viskosität in Zusammenhang gebracht werden und ist wohl sicher als

eine reine Dehydratation aufzufassen. In völligem Einklang damit steht die Senkung des spezifischen Leitwiderstandes.

Die Abb. 15 bis 17 zeigen den Zusammenhang zwischen den Änderungen in der Viskosität und dem spezifischen elektrischen Leitwiderstand, indem die Abszissen die Zeit in Stunden, die Ordinaten die Werte der Kolumnen 4 und 7 in Tabelle XXXIII bedeuten. Aus diesen Kurven erhellt sofort, daß ein gewisser Zusammenhang zwischen den Änderungen im Leitwiderstand und der Viskosität besteht. Für jede der drei Konzentrationen ist der Winkel, der von den beiden Kurven gebildet wird, im ganzen Verlauf ziemlich konstant und wird kleiner, je höher die Konzentration.

Tabelle XXXIV.

Verhältnisse zwischen Senkung der relativen inneren Reibung und des elektrischen Leitwiderstandes (R/W) bei verschiedenen Konzentrationen.

Molare Konzentration . 10^3 von Na_4-T.	R/W	Molare Konzentration . 10^3 von Na_4-T.	R/W	Molare Konzentration . 10^3 von Na_4-T.	R/W
1,1	7,0	2,0	6,6	4,4	3,1
	7,4		5,3		2,3
	8,7		4,6		3,4
	9,0		4,1		3,3
			3,7		3,2
			3,5		3,2
			3,5		3,1
			3,5		3,0
			3,5		2,9
			3,5		2,9
			3,4		2,8
			3,3		2,8
					2,7
Mittel:	8,0	Mittel:	4,0	Mittel:	3,0

In der Tabelle XXXIV sind die Verhältnisse zwischen den Werten in Kolumnen 4 und 7 aufgestellt. Diese Werte wurden durch graphische Interpolation aus den Kurven Abb. 15 bis 17 für jede 5 Stunden entnommen.

Diese Quotienten waren für jede Konzentration einigermaßen konstant, und es unterliegt wohl demnach keinem Zweifel, daß die Senkungen von Leitwiderstand und Viskosität mit der Zeit gleichzeitig verlaufen und dieselbe Ursache haben: eine Verminderung der offenbar sehr labilen Hydratation des Na_4-T. Ob diese im Sinne *Loebs* als ein Umschließen von Wasser durch aggregierte Moleküle zu denken ist oder nach *Pauli* als eine Ionenhydratation, mag dahingestellt sein. Gegen die Anwendung von *Loebs* Theorie spricht, daß gleichzeitig mit der starken Senkung der Viskosität mit der Zeit der osmotische Druck und die Interferometerwerte absolut konstant waren. Hat doch *Loeb* ge-

funden, daß eine Verminderung der Viskosität von Gelatinelösungen mit der Zeit bei höheren Temperaturen, einer Dispersion hypothetischer Micellae entsprechend, eine Erhöhung des osmotischen Druckes bewirkt. Bei 24 Stunden langer Erwärmung der Lösung von Na_4-T. (p_H 6,56) auf 40° wurde gleichzeitig mit der Senkung in Viskosität und Leitwiderstand eine Erhöhung der Interferometer- und C_H-Werte beobachtet, was deutlich eine Spaltung kundgibt.

Die relative innere Reibung des neutralen Ammoniumsalzes der Thymonucleinsäure war, wie Tabelle XII, Kolumne 6 zeigt, sehr viel kleiner als die von Na_4-T. Von derselben Größenordnung wie die Reibung des Ammoniumsalzes war die der Lysin- und Aminsalze. Die Albumin-, Histon- und Protaminsalzlösungen waren weniger viskös in kochsalzfreien Lösungen.

Tabelle XXXV.

Die relative innere Reibung eines Nucleinsäure-Eiweißsalzes in Kochsalzlösung.

Nr.	Normalität des zugesetzten NaCl	Relative innere Reibung	Nr.	Normalität des zugesetzten NaCl	Relative innere Reibung
1	0,76	2,082	4	1,94	2,752
2	1,17	2,256	5	2,69	3,771
3	1,40	2,357	6	3,50	9,384

$p_H = 4,22.$

Tabelle XXXVI.

Relative innere Reibung der Histon-Nucleinsäureverbindungen in Kochsalzlösungen.

Nr.		Normalität . 10^3 des zugesetzten Kochsalzes	Relative innere Reibung nach Stunden 24	48	72	96
1	I	0,0	7,77	6,93	6,28	5,96
2	3 Natriumatome in jedem	0,50			4,16	3,07
3	Nucleinsäuremolekül	1,0			3,63	3,37
4	zurück	2,0			3,54	4,42
5		5,0			6,45	7,90
6		10,0			(13,1) 12,5	(15,3) 18,5[1])
7	II	90,0			(15,5) 14,7	(47,0) 12,8[1])
8	2 Natriumatome in jedem	0,0	2,488		2,080	1,926
9	Nucleinsäuremolekül	0,5			1,299	1,299
10	zurück	1,0			1,294	1,294
11		2,0			1,283	1,283
12		10,0			Ausgeflockt	—

In den Versuchen Nr. 6 und 7 wurden mehrere Bestimmungen der Viskosität nacheinander gemacht, bis konstante Werte erhalten wurden. Die Lösungen waren nämlich wenigstens in Nr. 7 sehr deutlich gallertartig umgewandelt. Die ersten erhaltenen Werte sind eingeklammert.

[1]) Gallertbildung.

Über die Präparationen und Zusammensetzung der Nucleinsäure-Eiweißsalze s. Abteilung VII, S. 455.

Hier sei nur die Aufmerksamkeit darauf gelenkt, daß die Viskosität eines Albuminsalzes der Thymonucleinsäure bei Zusatz von Kochsalz eine sehr starke Erhöhung bei großen Konzentrationen an Kochsalz erfuhr (Tabelle XXXV). Noch mehr auffällig waren die Änderungen der relativen inneren Reibung zweier Histonnucleinsäure-Natriumsalze (Tabelle XXXVI). Nr. 1 war ziemlich stark viskös und bei Zusatz von Kochsalz wurde die Viskosität, wie zu erwarten war, zunächst gesenkt, weil die Verbindung ein Natriumsalz der Thymonucleinsäuremit einem Äquivalentgewicht Histon war. Bald aber *stieg* die Viskosität mit steigender Kochsalzkonzentration (Abb. 18), um bei 0,09 n des Kochsalzes in 4 Tagen durch *Gallertbildung zu versteifen.* Ultramikroskopisch waren jetzt leuchtende Massen von demselben Aussehen, wie S. 439 beschrieben ist, zu sehen.

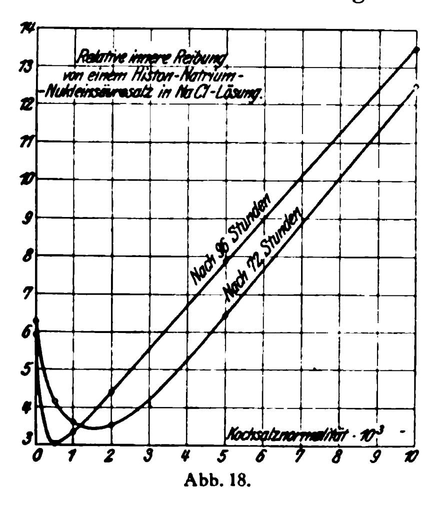


Abb. 18.

Die Verbindung Nr. II, die sich mehr wie ein Suspensionskolloid verhielt und wo zwei Äquivalente Histon auf ein Nucleinsäuremolekül kamen, wurde schon bei $10 \cdot 10^{-3}$ n des Kochsalzes ausgeflockt.

S. 386 wurde beschrieben, wie das Natriumsalz der Thymonucleinsäure aus der Histon- oder vielleicht Histon-Eiweißverbindung durch doppelte Umsetzung mit Kochsalz gewonnen wurde. In der nächsten Abteilung wird gezeigt werden, daß Lysin in Salzbindung mit Nucleinsäure bei Dialyse mit Kochsalz aus dieser Bindung quantitativ und glatt unter Bildung von Na_4-T. und Lysinchlorid abgespalten wurde. Weiter hat *H. Hammarsten* gezeigt (18), daß unter denselben Bedingungen aus einem Salze von Guanylsäure mit Histon das Natriumsalz der Guanylsäure und Histonchlorid entstehen. Das Aufsteigen der Kurven Abb. 18 kann wohl hiernach am leichtesten durch die Annahme erklärt werden, daß eine Spaltung eingetreten war unter Bildung von Histonchlorid und Na_4-T. Die außerordentlich hohe Viskosität der letzteren Verbindung könnte sehr gut die Erhöhung der inneren Reibung erklären, und ebenso würde die S. 458, Tabelle XLIII, besprochene Gallertbildung von Na_4-T. in Kochsalzlösungen die Gallertbildung im Versuch 7, Tabelle XXXVI, verständlich machen. Jedenfalls ist zurzeit keine andere Erklärung als diese Spaltungshypothese anwendbar, denn alle

bis jetzt bekannten Eiweiß-Salzlösungen erfahren durch Zusatz von Kochsalz eine Senkung der Viskosität bis zur Ausflockung.

Schlußfolgerungen.

1. Die relative innere Reibung von Na_4-T. ist außerordentlich hoch, und dieses Salz bindet in verdünnter Wasserlösung etwa 400mal sein eigenes Volumen Wasser.

2. Bei mehreren Eingriffen, die sämtlich die Viskosität der Natriumsalze erniedrigen, tritt eine nur zum Teil reversible Gallertbildung ein, die wahrscheinlich durch eine Phasenumkehr zustande kommt, indem die Nucleinsäurepartikeln agglutinieren und die geschlossene Phase bilden. Zur Erklärung der Gallertbildung von Natriumsalzen der Thymonucleinsäure braucht man nicht notwendig Spaltungen im Molekül anzunehmen.

3. Das a-Salz der Thymonucleinsäure ist ein Spaltungsprodukt, indem hier durch Hydrolyse esterartige Bindungen aufgelöst worden sind.

4. Die relative innere Reibung von Na_4-T. wird von Kationen schon in Konzentrationen unterhalb $1 \cdot 10^{-3}$ n mit mehreren Einheiten gesenkt. Die Konzentration und Valenz der Kationen ist hier von ausschlaggebender Bedeutung.

5. Von starken Säuren wird die relative innere Reibung von Na_4-T. außerordentlich stark gesenkt, wobei fast die ganze Senkung erreicht wird, wenn zwei Natriumatome durch Wasserstoff ersetzt worden sind.

6. Die relative innere Reibung von Eiweiß-Nucleinsäuresalzen wird durch Zusatz von Kochsalz gesteigert, was wahrscheinlich durch Bildung von Na_4-T. durch doppelte Umsetzung bedingt ist.

7. Da das Natriumsalz der Thymonucleinsäure wahrscheinlich in der Zelle vorkommen kann (s. Abteilung VII), sind die außerordentlich hohe Viskosität desselben und vielleicht auch die Gallertbildung als formbildende Faktoren in den Zellkernen zu beachten.

Abteilung VII.

Über die Salze der Thymonucleinsäure mit Aminosäuren und Eiweiß.

Von biologischem Gesichtspunkte ist die Salzbildung zwischen Nucleinsäureanion und den Ampholytkationen von allergrößtem Interesse. Die Nucleinsäuren könnten ja in den Zellen als Salze mit Ampholyten vorkommen, wenn die Wasserstoffionenkonzentration eine geeignete ist, also bei einer höheren C_H als der isoelektrischen Reaktion des betreffenden Ampholyts. Da die meisten Eiweißstoffe, die aus dem Tierkörper isoliert worden sind, eine isoelektrische Reaktion von p_H 4,5 bis 5 haben, so müßte demnach die C_H in den Zellkernen höher als 10^{-5} n liegen können, wenn Salze zwischen diesen Eiweiß-

stoffen und Nucleinsäuren da vorkommen würden. Man kennt aber nicht viel über die C_H in den Zellkernen, denn der oft besprochene saure Charakter des Zellkerns im histologischen Sinne berührt ja gar nicht die C_H. Vorläufig muß man es also völlig dahingestellt sein lassen, ob Nucleinsäuresalze mit Ampholyten, bei welchen $K_a > K_b$ ist, in den Zellen existieren können, denn Salzbildung bei Ampholyten mit einer isoelektrischen Reaktion bei $p_H = 4$ bis 5 fordern eine saurere Reaktion, als man in den Körper- und Zellsäften bis jetzt gefunden hat. Die Möglichkeit, ja Wahrscheinlichkeit, von lokalen Differenzen in der C_H innerhalb des Zellkerns besteht aber, und solche Differenzen können selbstverständlich nicht in Extrakten entdeckt werden.

In diesem Zusammenhange zu erwähnen ist eine Arbeit von *K. Rohde* (39), wo er durch Imbibition von Pflanzenzellen mit Indikatorlösungen deren C_H kolorimetrisch festzustellen versucht. Ich habe durch Einführen von verschiedenen Indikatoren in festem Zustande in Ovocyten erster Ordnung von Seeigeln einen p_H von 5,5 bis 6,0 an mehreren Stellen im Zellkern kolorimetrisch feststellen können. Einige lokale Verschiedenheiten im p_H des Zellkerns waren in diesen Zellen mit der angewandten Versuchsanordnung nicht zu sehen.

Je mehr sich die isoelektrische Reaktion der Ampholyte im Zellkern dem Neutralpunkte nähert, je wahrscheinlicher wird das Vorkommen von Ampholytsalzen der Nucleinsäuren. Die basischen Eiweißstoffe können selbstverständlich in dem Gebiete, wo sie noch nicht als Ampholyte reagieren, neutrale Salze mit den Nucleinsäuren bilden.

Für Glykokoll liegt der isoelektrische Punkt bei $C_H = 2{,}6 \cdot 10^{-7}$. *H. Hammarsten* (18) konnte zeigen, daß bei äquivalenter Konzentration von diesem Ampholyt und Guanylsäure bei einem p_H kleiner als 3 die Salzbildung nur etwa 40 Proz. von der theoretisch möglichen (bei den entsprechenden Konzentrationen einer starken Base und Säure) war. Befanden sich die Konzentrationen der Guanylsäure oder des Glykokolls im Überschuß, wurde die relative Salzbildung in beiden Fällen gesteigert. Die Salzbildung der Thymonucleinsäure mit Glykokoll verläuft unzweifelhaft nach sehr gleichartigen Kurven, da die erste Dissoziationskonstante fast dieselbe wie diejenige der Guanylsäure ist. Rechnerisch läßt sich aber dies nicht gut feststellen, weil bei kleineren C_H-Werten das zweite und dritte Dissoziationsstadium der Thymonucleinsäure einbezogen wird. Bei den niedrigen C_H-Werten, die biologisch von Interesse sind, kann man außerdem nicht mehr die Dissoziation des Wasserstoffs von den Carboxylgruppen des gebildeten Salzes außer acht lassen und die Dissoziationskonstante dieser Verbindung, $H^+ \vdots O^- OCCH_2NH_3OP$-Nucleinsäurerest, habe ich nicht feststellen können. Wahrscheinlich ist sie weit verschieden von K_a des Glykokolls. Wurde die Glykokollkonzentration bei konstanter

(1,14 . 10^{-3} mol.) Konzentration der Thymonucleinsäure variiert, verminderte sich, wie zu erwarten war, die C_H mit steigender Glykokollkonzentration im Anfang rasch (Tabelle XXXVII und Abb. 19), dann langsamer, um zuletzt fast asymptotisch zur Abszisse (Glykokollkonzentration) zu verlaufen. Die Erklärung hierzu liegt darin, daß die Nucleinsäurekonzentration viel größer war als diejenige, welche nötig gewesen wäre, um dem Ampholyte, unabhängig von dessen Konzentration, isoelektrische Reaktion zu geben.

Tabelle XXXVII.

Die Wasserstoffionenkonzentration in Lösungen von Thymonucleinsäure und Glykokoll.

Molare Konzentration . 10^3 des Glykokolls	p_H	Molare Konzentration . 10^3 des Glykokolls	p_H
0,21	3,064	9,60	4,012
0,50	3,145	12,00	4,093
1,10	3,305	14,00	4,109
2,10	3,449	16,10	4,141
3,20	3,596	270,0	4,559
5,40	3,819	530,0	4,881
7,50	3,867		

Die Kurve in Abb. 19 zeigt also nur, daß auch ein sehr großer Überschuß an Ampholyt nicht imstande war, die C_H einer etwa m/1000 Nucleinsäurelösung zu „biologischen" Werten niederzudrücken.

Das Salz zwischen Thymonucleinsäure und Glykokoll wurde bei fortschreitender Dialyse gegen Wasser fast vollständig hydrolytisch gespalten, so daß man bei Erneuerung der Außenflüssigkeit fast alles Glykokoll wegdialysieren konnte. Ob Kochsalz zugegen war oder nicht, machte in dem Verlauf der Dialyse keinen wahrnehmbaren Unterschied.

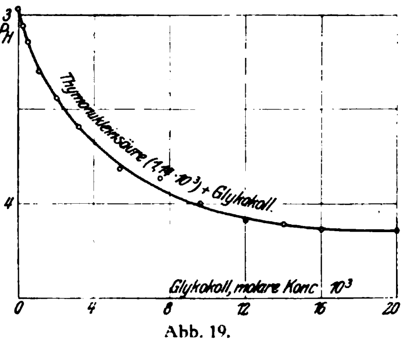


Abb. 19.

Die Tabelle XXXVIII gibt einen Dialysenversuch mit Glykokoll und Nucleinsäure in den Konzentrationen 0,036 bzw. 0,0036 Molarität wieder. Innenflüssigkeit ungefähr 10 ccm; Außenflüssigkeit = 100 ccm.

Die Bestimmungsmethode gestattet ja keine große Genauigkeit, und die Messungen in der zweiten Außenflüssigkeit sind unzuverlässig. Unzweideutig war aber das Glykokoll-Nucleinsäuresalz fast vollständig während der Dialyse hydrolytisch aufgespalten worden.

Tabelle XXXVIII.
Dialyse von Glykokoll bei Gegenwart von Thymonucleinsäure.

Normalität . 10^3 von zugesetztem Kochsalz	mg formoltitrierbarer Stickstoff			
	I In der ersten Außenflüssigkeit	II In der zweiten Außenflüssigkeit	I + II	Berechnet
0	5,0	0,10	5,10	5,15
0	4,98	0,10	5,08	
0	5,01	0,10	5,11	
0,1	5,09	0,09	5,18	
3,0	5,09	0,08	5,17	

Es ist kein Grund anzunehmen, daß nicht die Salze der Thymonucleinsäure mit „neutralem" Eiweiß nach denselben Gesetzen gebildet werden, wie die Salze dieser Eiweißkörper mit anderen Säuren. Daraus folgt, daß die Salzbildung eine Funktion von der Wasserstoffionenkonzentration sein muß. Die Nucleinsäure wird glatt aus den Eiweißsalzbindungen abgespalten werden können und Eiweiß-Nucleinsäuresalze werden nur bei Wasserstoffionenkonzentrationen existieren können, die höher liegen als der isoelektrische Punkt des Ampholytes.

Dreimal nach *Sörensen* umkristallisiertes Ovalbumin wurde zuerst bei p_H 4 etwa 4 Wochen lang unter 2 m Wasserdruck (Luftüberführung) mit Toluolzusatz in großen Kollodiumhülsen dialysiert. Die Außenflüssigkeiten wurden jeden zweiten Tag gewechselt. Dann wurde die Reaktion mit Natronlauge bis auf p_H 4,8 abgestumpft und die Eiweißlösung noch 2 Wochen dialysiert. Die filtrierte, strohgelbe, wasserklare Lösung, die bei Erhitzung absolut klar blieb, wurde mit einer Lösung von Na_4-T. versetzt. Das Verhältnis zwischen Eiweiß- und Nucleinsäurestickstoff wurde in zwei Serien variiert, wie Tabelle XXXIX, Kolumne 2, angibt.

Dann wurde die klare Lösung in zehn Proben geteilt und mit verschiedenen Mengen Salzsäure (in drei Fällen Essigsäure) versetzt. Die ausgefällten Nucleoproteide wurden in den Versuchen 6 bis 11 abzentrifugiert, zwischen Filtrierpapier einigermaßen getrocknet und sofort zwischen zwei dicken Goldscheiben in der Buchnerpresse bei 300 Atm. wiederholt ausgepreßt. Dank der Zähigkeit der Fällungen breiteten sie sich in einer gleichmäßigen zusammenhängenden Schicht aus, die zuletzt durchsichtig, hornartig wurde. Die Präparate wurden sofort gewogen und dann bis zu konstantem Gewicht im Vakuum bei 95° getrocknet. Konstante Gewichte wurden nach 6 Wochen erreicht. Der Gehalt an Stickstoff, Phosphor und Trockensubstanz in den Filtraten wurde auch bestimmt (Kolumnen 5, 6 und 8). Die spezifischen Gewichte wurden mittels *Westphals* Wage bestimmt (Kolumne 7). Da der Gewichtsverlust beim Trocknen der Fällungen bestimmt wurde

Tabelle XXXIX.
Nucleinsäure-Eiweißverbindungen.

Nr.	g Eiweiß-N	g Nucleinsäure-N	Zugesetzte Säure	Filtrat	g N in 100 ccm der Mutterlauge	g P in 100 ccm der Mutterlauge	Spez. Gewicht der Mutterlauge	g Trockensubstanz in 100 ccm der Mutterlauge	g Gewichtsverlust auf 100 g Substanz
1			20 ccm n/10 HCl	klar	Biuretprobe stark positiv				
2			15 ccm n/10 HCl	„	„				
3			10 ccm n/10 HCl	„	„				
4			20 ccm n/1 Essigsäure	„	schwach positiv				
5			20 ccm n/10 Essigsäure	„	„				
6	0,682	0,111	100 ccm n/10 HCl	schwache Opaleszenz	0,126	0,0016	1,0008	0,9792	28,3254
7			30 ccm n/10 HCl	D : o	0,102	0,0017	1,0003	0,7889	20,7881
8			Essigsäure zu maximal. Fällung	klar	0,064	0,0012	1,0051	0,6800	42,2880
9			10 ccm n/10 HCl	„	0,006	nicht bestimmbar	0,9985	0,1090	40,0162
10	0,218	0,148	50 ccm n/10 HCl	klar	0,000	0,000	0,9988	0,0505	21,1702
11			30 ccm n/10 HCl	starke Opaleszenz	0,005	0,0005	0,9985	0,1090	19,8758

(Die Werte 0,682 / 0,111 gelten für Nr. 1–9, die Werte 0,218 / 0,148 für Nr. 10–11.)

(Kolumne 9), konnten die Stickstoff- und Phosphormengen in den trockenen Fällungen berechnet werden, die aus den in den Fällungen gebliebenen und eingetrockneten Mutterlaugen stammten. Die Analysenresultate sind in der Tabelle XL dargestellt.

Tabelle XL zeigt die Resultate der Analysen der trockenen Nucleinsäureeiweißsalze auf Stickstoff und Phosphor. Die Versuche 1 bis 5 haben mehr den Charakter von Vorversuchen. Die Fällungen wurden hier abfiltriert und mit Puffermischungen von demselben p_H wie die der ersten Filtrate gewaschen. Diese gaben alle Biuretreaktion. Bei der Waschung gingen nicht unbeträchtliche Mengen Eiweiß in die Filtrate. Die Waschung wurde so lange fortgesetzt, bis die Filtrate keine Biuretreaktion mehr gaben. Dann wurde mit Wasser gründlich gewaschen, mit Alkohol und Äther getrocknet und lufttrocken analysiert. In zwei Versuchen (nicht in der Tabelle XXXIX aufgenommen), wo Fällungen bei p_H 4,594 und 4,618 zustande kamen, gingen die Fällungen bei der Waschung mit Puffermischungen von demselben p_H und bei der folgenden Waschung mit Wasser unter starker Quellung vollständig in Lösung.

Die Versuche 6 bis 11 wurden in der oben beschriebenen Weise ausgeführt, um die Zusammensetzung der Eiweißsalze im Gleichgewicht mit der Mutterlauge erhalten zu können. In den Versuchen 1 bis 5, wo ein Teil des Eiweißes weggewaschen wurde, kann man erwarten,

Tabelle XL.

Analysen auf Stickstoff und Phosphor in Eiweiß-Nucleinsäureverbindungen.

Nr.	g der Substanz	MgN	Proz. N	g $Mg_2P_2O_7$	Proz. P
1	0,0830	11,54	13,90		
	0,0349	4,87	13,96		
	0,1928			0,0236	3,42
2	0,0320	4,37	13,66		
	0,0684	9,34	13,65		
	0,1484			0,0162	3,05
	0,1764			0,0188	2,97
3	0,0669	9,13	13,65		
	0,0636	8,64	13,58		
	0,4435			0,0329	2,07
	0,4775			0,0341	1,99
4	0,0989	13,33	13,48		
	0,0802	10,86	13,55		
	0,3717			0,0195	1,46
	0,4100			0,0223	1,52
5	0,0751	10,12	13,48		
	0,0802	10,84	13,52		
	0,2017			0,0171	2,36
	0,2962			0,0246	2,32
6	0,2222	33,74	15,18		
	0,1100	16,89	15,35		
	0,5848			0,0670	3,20
	0,6642			0,0796	3,33
7	0,1576	22,58	14,32		
	0,0850	12,19	14,34		
	0,6253			0,0477	2,12
	0,3622			0,0272	2,09
8	0,0980	15,03	15,34		
	0,0908	14,04	15,46		
	0,9498			0,0598	1,75
	1,0254			0,0629	1,71
9	0,0977	14,97	15,32		
	0,0940	14,37	15,29		
	0,9028			0,0468	1,44
	1,1652			0,0583	1,39
10	0,1134	17,54	15,47		
	0,8726			0,1149	3,66
	0,8008			0,1045	3,63
11	0,1262	19,78	15,67		
	0,1189	18,48	15,54		
	0,8509			0,1105	3,62
	1,0555			0,1368	3,61

daß das Verhältnis zwischen Eiweiß und Nucleinsäure niedriger sein soll als in den Versuchen 6 bis 9. Aus der Zusammensetzung der Filtrate (Versuche 6 bis 11, Tabelle XXXIX, Kolumnen 5 und 6) geht hervor, daß in Nr. 1 bis 9 ein Überschuß an Eiweiß vorhanden war in dem Sinne, daß die Mutterlaugen alle Eiweiß enthielten. Die Nucleinsäure wurde in Nr. 6 bis 11 fast vollständig ausgefällt, indem die Phosphormengen in 100 ccm der Mutterlauge kaum bestimmbar waren. Wenn das Eiweiß im Verhältnis zur Nucleinsäure in den Lösungen vor der Ausfällung stark vermindert wurde (Nr. 10 und 11), ging kein Eiweiß in die Mutterlaugen, die auch phosphorfrei waren.

Innerhalb sehr weiter Grenzen in bezug auf das Verhältnis Eiweiß : Nucleinsäure und auf p_H kam also eine vollständige gegenseitige Ausfällung von Eiweiß und Nucleinsäure zustande. Dies war ja auch zu erwarten, da man es hier mit Salzbildung zwischen einem polyvalenten Ampholyt und einer vierbasischen Säure zu tun hat. Die Versuche bestätigen also die von vornherein wahrscheinliche Annahme, daß die Eiweißsalze mit Nucleinsäuren, sogenannten Nucleoproteiden und Nucleinen, von sehr wechselnder Zusammensetzung sein können.

Tabelle XLI.
Verhältnis zwischen Eiweißstickstoff und Nucleinsäure.

Nr.	g Eiweiß-N auf 100 g Substanz	g Phosphor in 100 g Substanz	Zahl der g-Atome Eiweiß-N auf 1 Mol. Nucleinsäure	p_H im Filtrate nach Ausfällung der Eiweiß-Nucleinsäureverbindungen
1	8,14	3,42	21,1	1,986
2	8,54	3,01	25,12	2,308
3	10,17	2,03	44,40	3,099
4	10,99	1,49	65,36	3,317
5	9,52	2,34	(36,04)	4,389
6	9,73	3,26	26,44	1,868
7	10,73	2,11	45,08	2,847
8	12,47	1,74	63,52	3,176
9	12,90	1,42	80,48	4,509
10	9,27	3,65	22,48	2,122
11	9,47	3,61	23,24	2,885

Die Tabelle XLI gibt (Kolumne 4) die Zahl der Gramm-Atome Stickstoff auf ein Molekül Nucleinsäure. Hierbei wurde mit 15 . 14,01 g Stickstoff auf 4 . 31,04 g Phosphor gerechnet. Der Nucleinsäurestickstoff wurde nach diesem Verhältnis aus den gefundenen Phosphorwerten (Kolumne 3) berechnet und von den gefundenen Stickstoffwerten (Kolumne 4, Tabelle XL) abgezogen (Kolumne 2, Tabelle XLI). (In den Versuchen 6 bis 11 wurden die N- und P-Werte, Tabelle XL, zuerst für den Stickstoff- und Phosphorgehalt der eingetrockneten Mutterlaugen korrigiert.) Die Differenzen wurden als Eiweißstickstoff

angesehen, und dieser Eiweißstickstoff auf 4 . 31 g Phosphor (= 1 g-Mol. Nucleinsäure) umgerechnet. Die so erhaltenen Zahlen stehen in Kolumne 4, die in den Mutterlaugen gefundenen p_H-Werte in Kolumne 5. Mit sinkender Wasserstoffionenkonzentration wurde, wie diese Reihen zeigen, immer mehr Eiweiß als Nucleinsäuresalz gebunden. Werden die Zahl der Gramm-Atome Stickstoff an der Ordinate, die zugehörigen p_H-Werte an der Abszisse abgesetzt, erhält man die Kurve Abb. 20.

Es ist sicher keine Zufälligkeit, daß diese eine Knickung bei demselben p_H (3,2) zeigt, wo nach Abb. 2 (S. 395) das dritte Wasserstoffatom in der Nucleinsäure zu dissoziieren beginnt. Wenn die Nucleinsäure in bezug auf das erste und zweite Dissoziationsstadium mit Eiweiß gesättigt ist, verläuft die Salzbildung nunmehr in den schwächeren dritten und vierten Säuregruppen langsamer. Mit Eiweiß sehr stark beladene Nucleoproteide können, wie die Kurve zeigt, ganz in der Nähe von dem isoelektrischen Punkte des Eiweißes als Fällungen im Gleichgewicht mit salz- und eiweißhaltigen Lösungen (Tabelle XLI, Nr. 5 und 9) existieren. Diese schwach sauren Nucleoproteide lösten sich leicht und vollständig bei Zusatz von Kochsalz (Tabelle XXXV, S. 447) wahrscheinlich unter doppelter Umsetzung zu Natriumsalzen der Nucleinsäure und Chloriden des Eiweißes. Die schwach sauren Nucleoproteide sind unzweifelhaft als doppelte Salze von Natrium und Eiweiß mit der Nucleinsäure zu betrachten. Wurden diese Nucleoproteide in Ammoniumsulfat gelöst, die Lösungen gegen Lackmus neutralisiert und dann mit Ammoniumsulfat gesättigt, konnte aus den Filtraten vollständig eiweißfreies Nucleinsäuresalz mit Eisenchlorid ausgefällt werden. Wenn das Eiweiß in dem isoelektrischen Punkte oder auf der alkalischen Seite desselben ausgesalzen wurde, blieb also eiweißfreies Nucleinsäuresalz in der Lösung, wie zu erwarten war, wenn die Nucleoproteide Ampholytsalze sind. In einer früheren Arbeit (40) habe ich gezeigt, daß ein eiweißfreies Nucleinsäuresalz aus einem Pankreasnuclein in der soeben beschriebenen Weise herstellbar ist. Die hier benutzte Darstellungsmethode (S. 386) für Na_4-T. bestätigt in schönster Weise, daß die Nucleinsäure in neutraler salzhaltiger Lösung aus Eiweißsalzbindung glatt abgespalten werden kann.

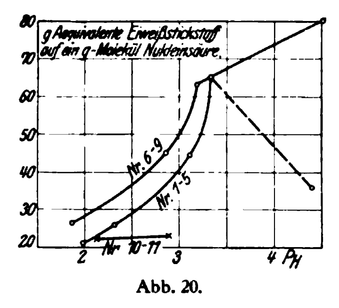


Abb. 20.

Bei der Darstellung von Nucleoproteiden und sogenannten Nucleinen aus den Organen durch Fällung der neutralen Extrakte mit Säuren bekommt man phosphorreichere Eiweißverbindungen, je mehr Säure zugesetzt wird, was nach Abb. 20 leicht verständlich wird. Die zwei Versuche Nr. 10 und 11, Tabellen XXXIX bis XLI, wo mehr Nuclein-

säure im Verhältnis zu Eiweiß als in den anderen Versuchen vor der Ausfällung vorhanden war, zeigen, daß das Eiweiß nunmehr auch bei stark saurer Reaktion vollständig ausgefällt wurde. Die sauren Nucleinsäureeiweißsalze (ungefähr bis zu p_H 3,5 in Abb. 20) konnten mit Alkohol in feuchtem Zustande gewaschen und getrocknet werden, ohne daß das Eiweiß denaturiert wurde (vollständige Lösung in Natronlauge bei schwach saurer Reaktion). Wenn eine schwach saure Lösung, p_H 4,2, von einem Nucleinsäureeiweißsalz in Kochsalz erhitzt wurde, blieb eine große Menge Eiweiß in Lösung. Bei Zusatz von Essigsäure zu der erkalteten Lösung fiel eine phosphorreiche Eiweißverbindung aus. In diesen beiden Hinsichten verhielten sich die Nucleinsäureeiweißsalze wie die „natürlichen“ Nucleoproteide.

Es sei nochmals hervorgehoben, daß die Nucleinsäureeiweißsalze in den hier geschilderten Versuchen sich im Gleichgewicht mit salzhaltigen (Kochsalz, Natriumacetat) Lösungen befanden. Wie vorher erwähnt, haben diese und andere Salze die Eigenschaft, Nucleinsäureeiweißsalze in Lösung zu halten. Trotzdem traten die Nucleinsäureeiweißfällungen wenigstens teilweise schon in der nächsten Nähe des isoelektrischen Punktes auf. Diese Tatsache weist unzweideutig darauf hin, daß bei größeren Eiweißkonzentrationen die Nucleoproteide im Zellkern, wenn vorhanden, im ausgefällten Zustande existieren können. Bei dem in den Versuchen 10 bis 11 angewandten Konzentrationsverhältnis war es dagegen nicht möglich, Fällungen bei Wasserstoffionenkonzentrationen, die niedriger als C_H ungefähr $= 1 \,.\, 10^{-3,5}$ zu erzeugen. Nucleinsäureeiweißsalze können also in gelöstem Zustande nur in dem Falle existieren, daß sie viel Natrium- oder andere gleichartige Ionen enthalten.

Mit der di-Aminosäure Lysin bildet die Thymonucleinsäure ein neutrales vierwertiges Salz. Dieses Salz wurde in der für die Aminsalze beschriebenen Weise bereitet (S. 407). Das Lysin konnte in der Verbindung direkt durch Formoltitration bestimmt werden. In den zwei Präparaten, die für die Versuche in Tabelle XLIII zur Anwendung kamen, war das Verhältnis Nucleinsäure : Lysin = bzw. 1/3,95 und 1/4,4. Wie schon vorher erwähnt, unterlag dieses Salz, wie auch Histonguanylat, bei Dialyse in Kochsalzlösung einer doppelten Umsetzung, wobei Lysinchlorid und das Natriumsalz der Thymonucleinsäure gebildet wurden. Die Lösungen des Lysinsalzes der Thymonucleinsäure wurden in montierte Kollodiumhülsen gebracht und gegen Wasser oder Kochsalzlösungen dialysiert. Das Volumen der Innenflüssigkeiten war in allen Versuchen = 10 ccm, das der Außenflüssigkeiten = 100 ccm. Die Innenflüssigkeiten waren gegen die Luft dicht abgeschlossen, wodurch größere Volumenänderungen während der Dialyse vermieden wurden. Die Außenflüssigkeiten wurden zweimal während

36 Stunden erneuert, so daß 10 ccm Innenflüssigkeit gegen dreimal 100 ccm Außenflüssigkeit jedesmal 12 Stunden dialysierte. Die Versuchstemperatur war wie gewöhnlich 20°. Die Außenflüssigkeiten wurden durch Natronkalkröhre gegen die Luft abgeschlossen. In einigen Vorversuchen wurden zuerst geeignete Kollodiumhülsen durch Prüfung auf ihre Permeabilität für Lysinchlorid ausgewählt. Die Durchlässigkeit der sechs besten geht ohne weiteres aus Tabelle XLII hervor.

Tabelle XLII. Die Permeabilität der Kollodiumhülsen für Lysinchlorid.

Nr. der Dialysehülse	mg Stickstoff in der Außenflüssigkeit nach Dialyse in Stunden			mg Stickstoff in der Innenflüssigkeit nach dem dritten Umtausche von Außenflüssigkeit	Wiedergefundener Stickstoff in Proz. vom Totalen (11,28 mg)	
	7	17	12		außen	innen + außen
1	8,83	2,10	0,14	0,14	98,1	99,3
2	9,19	1,82	0,14	0,14	98,8	100,0
3	9,44	1,37	0,06	0,14	96,4	97,6
4	9,39	1,34	0,14	0,14	96,4	97,6
5	9,44	1,40	0,14	0,14	97,3	98,5
6	9,35	1,26	0,14	0,14	95,3	96,5

Diese Versuche wurden, wie soeben für die Lysin-Nucleinsäurelösungen beschrieben, ausgeführt. Die Bestimmungen des totalen Stickstoffs wurden hier und in den Versuchen Tabelle XLIII nach *Kjeldahl* gemacht (Verbrennung in 12 Stunden und Oxydation mit $KMnO_4$ wegen der Schwerverbrennlichkeit des Lysins). Die Kolumne 6, Tabelle XLII zeigt, daß unter den Versuchsbedingungen ungefähr 96 Proz. des Lysins in die Außenflüssigkeiten in 36 Stunden dialysierten.

Tabelle XLIII. Dialyse des Lysinsalzes der Thymonucleinsäure.

Nr.	Vor der Dialyse			Nach der Dialyse				Wiedergefundener Stickstoff in Proz. von dem berechneten	„Salzwirkung"
	innen			innen		außen			
	Salz Norm. 10^3	Formol-N mg	Total-N mg	Formol-N mg	Total-N mg	Formol-N mg	Total-N mg		
1	0,5	6,80	19,71	2,67	15,47	4,02	4,22	99,9	34
2	1,0	5,49	14,83	1,68	11,08	3,56	3,73	99,9	42
3	2,0	6,80	19,71	1,06	13,31	5,30	6,13	98,6	53
4	3,0	6,80	19,71	0,84	12,32	5,74	6,87	97,4	59
5	4,0	6,80	19,71	0,89	12,71	5,79	6,82	99,1	60
6	5,0	5,49	14,83	0,42	9,83	4,58	5,03	100,2	61
7	25,0	5,49	14,83	0,28	9,43	4,79	5,42	100,2	65
8	125,0	5,49	14,83	0,25	9,06[1])	5,08	5,61	98,9	70[1])
									Nullwert
9	0,0	5,49	14,83	4,20	12,15	1,27	2,35	97,8	23,1 } 22,5
10	0,0	5,49	14,83	4,28	12,20	1,20	2,34	98,0	21,9 }
11	0,0	6,80	19,71	4,97	17,16	1,68	2,47	99,6	24,7 } 25,2
12	0,0	6,80	19,71	4,97	17,09	1,75	2,52	99,5	25,7 }

[1]) Gelatiniert.

In den Versuchen Nr. 9 bis 12, Tabelle XLIII, wurde Lysin-Nucleinsäure gegen Wasser dialysiert. In 9 und 10 war das Verhältnis $\frac{\text{Nucleinsäure}}{\text{Lysin}} = 1/3{,}95$, in 11 und 12 $= 1/4{,}4$. Der Nullwert, der die Mengen von formoltitrierbarem Stickstoff in den Außenflüssigkeiten (Kolumne 7) in Prozenten der im Anfang in den Innenflüssigkeiten vorhandenen Mengen (Kolumne 3) bedeutet, ist nicht identisch mit dem durch die fortschreitende Hydrolyse abgespaltenen Lysinstickstoff, denn gleichzeitig dialysierte ein wenig Nucleinsäureverbindung, was durch das Überwiegen an totalem Stickstoff gegenüber dem Formolstickstoff (Kolumnen 7 und 8) zu sehen war.

In einer hier nicht wiedergegebenen Versuchsserie wurde die Permeabilität der Kollodiumhülsen für Na_4-T. geprüft, wobei eine Durchlässigkeit unter den beschriebenen Versuchsbedingungen von ungefähr 3 Proz. einer Na_4-T.-Lösung mit 11,45 mg Stickstoff auf 10 ccm gefunden wurde. Wenn man aber die Durchlässigkeit in den Versuchen Tabelle XLIII für Nucleinsäurestickstoff als die Differenzen zwischen den Zahlen Kolumnen 7 und 8 zu berechnen sucht, kommt man zu sehr wechselnden Resultaten, was auch bei der Unsicherheit der Formoltitrierung zu erwarten war. In den Versuchen 1 bis 8 hatten die Innenflüssigkeiten vom Anfang an die in Kolumne 2 angegebenen Kochsalzkonzentrationen. Dieselben Kochsalzkonzentrationen hatten auch die erneuerten Außenflüssigkeiten. Nach dreimal 12 Stunden wurden die vereinigten Außenflüssigkeiten auf dem Wasserbade eingedunstet und nach *Sörensen* formoltitriert. Das ganze Volumen der Innenflüssigkeiten wurde ebenfalls formoltitriert. Die Mengen Säure (außen) und Alkali (innen), die nötig waren, um den Flüssigkeiten einen p_H von 6,8 zu geben, waren sehr gering (ungefähr 0,2 bis 0,3 ccm n/5 Lösung) und in den salzhaltigen Lösungen nicht größer als in den salzfreien. Nach der Formoltitrierung wurden die formolhaltigen Lösungen nach *Kjeldahl* verbrannt und der totale Stickstoff bestimmt. Die Kolumnen 5 und 7 zeigen, daß in den Salzversuchen der formoltitrierbare Stickstoff in den Innenflüssigkeiten mit dem Gehalt an Kochsalz sank, in den Außenflüssigkeiten stieg. Die „Salzwirkung" wurde als die Menge von formoltitrierbarem Stickstoff in den Außenflüssigkeiten nach Dialyse (Kolumne 7) in Prozenten von demjenigen in den Innenflüssigkeiten vor Dialyse (Kolumne 3) ausgedrückt. Von diesen Zahlen wurden die zugehörigen Nullwerte abgezogen. Die so erhaltenen Werte sind in der Kolumne 10 aufgestellt.

In Abb. 21 sind die Resultate graphisch wiedergegeben, indem die „Salzwirkung" an der Ordinate, die Kochsalzkonzentrationen an der Abszisse abgesetzt sind. Da die Thymonucleinsäure keinen formoltitrierbaren Stickstoff enthielt und die Lösungen auf beiden Seiten der

Membran nur der Hydrolyse entsprechende Mengen Säure und Alkali zu neutraler Reaktion verbrauchten, zeigt die Kolumne 10 Tabelle XLIII und die Kurve Abb. 21, daß das neutrale Lysinsalz der Thymonucleinsäure durch Kochsalz in außerordentlich kleinen Konzentrationen bei fortschreitender Dialyse in Lysinchlorid und das Natriumsalz der Nucleinsäure gespalten wurde. Man muß voraussetzen, daß derartige Spaltungen unter doppelter Umsetzung auch in den Zellen erfolgen, sobald Nucleinsäuresalze mit einem diffusiblen Ion gleichzeitig mit Kochsalz oder anderen Salzen vorhanden sind. Diese Umsetzung ist analog mit dem von *Donnan* (8d) aufgeklärten Umtausch von Ionen z. B. bei Dialyse von Ferrocyan- und Alkalisalzen.

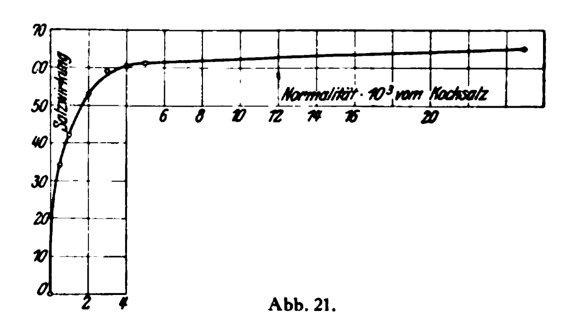


Abb. 21.

Es wurde schon auf S. 447 gezeigt, daß sowohl Lösungen von sauren Nucleoproteiden wie von neutralen Histonnucleinsäuresalzen bei großen Kochsalzkonzentrationen ihre Viskosität sehr stark steigern. Diese Steigerung wurde mit Wahrscheinlichkeit auf eine Verschiebung im Gleichgewicht zwischen den vorhandenen Basen und Säuren, welche zur Bildung des Natriumsalzes der Thymonucleinsäure führte. Diese Auffassung von der sehr eigentümlichen Viskositätssteigerung eines Eiweißsalzes bei Zusatz von Kochsalz wird durch die Resultate über die Salzwirkung bei Dialyse der Lysinverbindung in hohem Grade befestigt.

Die auf S. 448 besprochenen Histon-Nucleinsäuresalze wurden in folgender Weise hergestellt.

Eine saure Histonchloridlösung, die 6,17 Proz. Cl enthielt, wurde mit einer Menge Natronlauge versetzt, die 54,5 Proz. vom totalen Chlorgehalt entsprach. Die Wasserstoffionenkonzentration der Lösung war dann (elektrometrisch gemessen) $10^{-6,945}$ n. Diese Lösung wurde in drei Portionen geteilt und jede mit Natronlauge bis zu 0,1 Normalität versetzt. Die alkalischen Lösungen wurden dann mit Na_4-T.-Lösung in solchen Mengen versetzt, daß das Natrium in dem zugesetzten Na_4-T. bzw. 12/3, 6/3 und 3/3 vom Chlor im neutralen Histonchlorid entsprach. Die klaren Lösungen wurden nun unter Umschüttelung mit einer gegen

die überschüssige Natronlauge äquivalente Menge Salzsäure langsam versetzt. Im Falle von vollständiger Umsetzung würden also Salze mit den folgenden Verhältnissen zwischen Histon, Natrium und Nucleinsäure gebildet werden:

I. Hi-3-Na-T., II. 2 Hi-2-Na-T., III. 4 Hi-T., wo Hi ein Gewicht Histon bezeichnet, das 1 g-Atom Chlor entspricht, T. 1 g-Mol. Nucleinsäure und Na 1 g-Atom Natrium bedeuten. Die Histon- und Na_4-T.-Lösungen wurden bei alkalischer Reaktion gemischt, weil sonst in allen Mischungsverhältnissen eine unlösliche Verbindung ausfiel. In Versuchen 1 und 2 entstanden opaleszente Lösungen, im Versuch 3 eine grobflockige Fällung. Die drei Flüssigkeiten (mit der Fällung in Nr. 3) wurden gegen Wasser unter Druck 2 Wochen dialysiert, wobei die Außenflüssigkeiten zweimal jeden Tag gewechselt wurden. Potentiometrische Wasserstoff- und Chlorionenbestimmungen in den Innenflüssigkeiten nach der Dialyse zeigten folgende Werte.

Tabelle XLIV.

	I	II	III
p_H	6,895	6,961	unsicher
p_{Cl}	4,22	3,77	unsicher, von d. Größenordnung des destillierten Wassers

10 ccm von I und II gaben nach Eindampfen und Veraschung kaum wahrnehmbare Reaktion auf Cl mit Silbernitrat. Die schwach opaleszente Mutterlauge in Nr. III wurde abgegossen und die Fällung nach Waschen mit Wasser, Alkohol und Äther getrocknet. Nr. I und II hatten während der Dialyse keine Fällungen abgesetzt, und abgemessene Mengen wurden zur Analyse auf dem Wasserbade zum Trocknen abgedampft. Die drei Präparate wurden schließlich im Vakuum bei 90° zu konstantem Gewicht getrocknet und auf Stickstoff und Phosphor analysiert. Die Resultate sind in den Tabellen XLV und XLVI zusammengestellt.

Unter der Annahme, daß in dem Nucleinsäuremolekül 4 Atome Phosphor 15 Atomen Stickstoff entsprechen, ließ sich der Stickstoff in Histon- und Nucleinsäurebindung gesondert berechnen (Tabelle XLVI, Kolumne 3 und 4). Die Zahlen der Gramm-Atome Histonstickstoff auf 1 g-Mol. Nucleinsäure verhielten sich (Kolumne 5) wie 1 : 2 : 3,74. Da die Kollodiumhülsen weder für die Nucleinsäure noch für das Histon permeabel waren, konnte die Zusammensetzung in bezug auf diese Komponenten während der Dialyse nicht durch fortschreitende Hydrolyse geändert worden sein. Dies wird auch durch die p_H-Werte, Tabelle XLIV, gezeigt. Die niedrigen Cl-Ionenkonzen-

Tabelle XLV.

Analysen auf Stickstoff und Phosphor in Histon-Nucleinsäureverbindungen.

Nr.	g der Substanz	Mg N	Proz. N	g $Mg_2P_2O_7$	Proz. P	Mittel	N/P
I	0,1700	28,01	16,48			16,44	2,952
	0,1356	22,22	16,39			Proz. N	
	0,3797			0,0760	5,58	5,57	
	0,5526			0,1104	5,57	Proz. P	
II	0,0984	16,66	16,93			16,94	4,132
	0,1193	20,21	16,94			Proz. N	
	0,4565			0,0659	4,02	4,10	
	0,3800			0,0569	4,17	Proz. P	
III	0,0695	12,12	17,44			17,47	6,376
	0,1383	24,21	17,50			Proz. N	
	0,4707			0,0463	2,74	2,74	
	0,4462			0,0439	2,74	Proz. P	

Tabelle XLVI.

Verteilung des Stickstoffs in den Histon-Nucleinsäureverbindungen.

Nr.	Stickstoff in Proz. als			g Atome Histon-Stickstoff auf 1 g-Mol. Nucleinsäure
	Total-N	Histon-N	Nucleinsäure-N	
I	16,44	7,01	9,43	11,1
II	16,94	10,00	6,94	21,6
III	17,47	12,83	4,64	41,5

11,1 : 21,6 : 41,5 = 1 : 1,95 : 3,74.

trationen geben vollständige Umsetzung an, und da die Wasserstoffionenkonzentrationen dieselben wie in den neutralen Histonchlorid- und Na_4-T.-Lösungen waren, kann man ohne Natriumanalysen behaupten, daß die zwei ersten Histon-Nucleinsäuresalze Natrium im Verhältnis $\overset{I}{3} : \overset{II}{2}$ enthielten.

Die Verbindungen I und II waren in Wasser löslich, und die Lösungen zeigten im Ultramikroskop Massen von lebhaft beweglichen Partikeln. Die Lösung von Nr. II hatte den Charakter eines Suspensionskolloids und wurde sehr leicht von Kochsalz ausgefällt (Tabelle XXXVI). Bei Zusatz von mehr Kochsalz bis zur Sättigung wurde diese Fällung teilweise aufgelöst.

Die verschiedene Viskosität von Nr. I und II kann dadurch erklärt werden, daß in Nr. I 3, in Nr. II nur 2 Atome Natrium auf jedes Nucleinsäuremolekül kamen. Wie Abb. 13 zeigt, beginnt nämlich die Viskosität in Lösungen von Natriumsalzen der Thymonucleinsäure erst bei 3 Natriumatomen zu steigen. Calciumchlorid fällte schon in geringen Konzentrationen sowohl Nr. I als Nr. II. Ein Vergleich der Eigenschaften dieser Histon-Nucleinsäuresalze mit denjenigen des sogenannten natürlichen Nucleohistons ist nicht zulässig, weil dieses offenbar auch

andere Eiweißkörper als Histon enthalten kann. Es muß doch vorläufig dahingestellt bleiben, ob die Nucleinsäure in der Thymusdrüse in Verbindung mit nur Histon oder Histon und Natrium oder auch mit „neutralem“ Eiweiß vorkommt. Da aber eine Verteilung der Nucleinsäure zwischen den stärkeren Basen in den Zellen bei der fast neutralen Reaktion der Körpersäfte wahrscheinlicher ist als eine Ampholytsalzbildung, haben die Eigenschaften der Histon-Natrium-Nucleinsäuresalze großes biologisches Interesse.

Besonders einfach liegen die Verhältnisse in bezug auf das Nucleinsäuresalz mit Protamin in den Spermatozoen des Herings. *Steudel* (41) konnte hier den Nachweis bringen, daß die Zusammensetzung eines natürlichen Nucleoprotamins mit dem von ihm aus Nucleinsäure und Protamin hergestellten nucleinsauren Salz von Protamin völlig übereinstimmte. Beim Zusammenbringen von zwei Lösungen aus nucleinsaurem Natriumsalz und schwefelsaurem Histon in äquivalenten Mengen (in bezug auf Na und H_2SO_4) erhielt *Steudel* (42) eine Fällung, die ein Verhältnis N : P = 3,21 zeigte. Aus der Thymusdrüse konnte er Präparate herstellen, wo dasselbe Verhältnis 3,44 war. Ein solches Präparat von *I. Bang* gab 3,23 und von *Lilienfeld* 5,57. Wenn *Steudel* nucleinsaures Histon nach *Lilienfeld* herstellte, fand er dasselbe Verhältnis = 5,40. Im Vergleich damit zeigten meine löslichen Verbindungen folgende Verhältnisse: N/P : I = 2,95; II = 4,13; während die unlösliche Verbindung III 6,38 gab. Wie *Steudel* (43) gezeigt hat, enthalten nun die Nucleohistone aus der Thymusdrüse Phosphor in anorganischer Bindung, wonach die gefundenen Verhältnisse hier zu klein sein müssen. *Steudel* gibt weiter an, daß er sein schwefelsaures Histon aus saurer Lösung mit Alkohol fällte. Demnach hat er mit einem Histonsalz gearbeitet, das nicht neutral war, sondern auch Schwefelsäure in Ampholytsalzbindung enthielt. Es ist daraus leicht verständlich, daß dieses Salz relativ mehr Nucleinsäure als mein Präparat III enthalten mußte. Meine Präparate I und II waren neutrale Doppelsalze der Thymonucleinsäure mit Natrium und Histon, *Steudels* Präparat ein gemischtes Neutral- und Ampholytsalz.

Die Schwierigkeit, alles Histon aus den Nucleinsäureverbindungen mit Salzsäure zu extrahieren, ist wahrscheinlich völlig analog mit derselben Erscheinung bei den Eiweißampholytsalzen mit Nucleinsäure (Nucleoproteiden). Wenn man Salzsäure im Überschuß zu neutralem Nucleohiston zusetzt, wird nur ein Teil des Histons extrahiert, und der Rest bindet sich wie jedes andere ampholytisch reagierende Eiweiß an die Nucleinsäure zu einer sauren *unlöslichen* Verbindung. Bei neutraler Reaktion wird dagegen von dieser *scheinbar* festen Bindung gar nichts bemerkt. Aus den neutralen Eiweiß-Nucleinsäuremischungen aus Thymus und Pankreas lassen sich die Eiweißkörper durch Neutral-

salze ausfällen, und das entsprechende Salz der Nucleinsäure bleibt in Lösung. Im Thymusextrakt, wo neutrale Salze zwischen Nucleinsäure und Histon vorkommen, tritt eine glatte Abspaltung des Eiweißes durch eine doppelte Umsetzung ein; in solchen neutralen Nucleinsäure-Eiweißlösungen, wo keine Eiweißkörper mit $K_b > K_a$ vorhanden sind, kann die Nucleinsäure kein Salz mit dem Eiweiß bilden, und die Ausfällung von nucleinsäurefreiem Eiweiß geschieht also ohne vorhergehende Abspaltung. *Steudel* ist offenbar der Ansicht, daß die Nucleoproteide Salze zwischen basischen Eiweißstoffen und Nucleinsäuren sind, und sagt unter anderem: „... die Befunde, bei denen wohl Nucleinsäuren, aber keine basischen Eiweißkörper sich haben aus Organen oder Zellkernen extrahieren lassen, scheinen darauf hinzudeuten, daß Nucleinsäuren auch in anderer Bindung, etwa an anorganische Basen, in der Zelle vorkommen können" (44, S. 301). Ich will hierzu bemerken, daß alle Eiweißstoffe Salze mit Nucleinsäuren wie mit jeder anderen hinreichend starken Säure bilden können, und daß die Zusammensetzung der sauren Ampholytsalze mit Nucleinsäure, wie oben gezeigt wurde, bei gegebenen Konzentrationsverhältnissen zwischen Ampholyt und Nucleinsäure eine Funktion der Wasserstoffionenkonzentration ist. Bei Mischungen in der Zelle von Nucleinsäure und Eiweißkörpern oder anderen Ampholyten mit ihrer isoelektrischen Reaktion auf der sauren Seite des Neutralpunktes muß man sich bei einem Reaktionsgebiet zwischen der isoelektrischen Reaktion und alkalischer Reaktion vorstellen, daß die Nucleinsäure als Salz mit anorganischen Basen vorkommt. Nur in dem Falle, daß die Reaktion in der Zelle saurer wird als entsprechend der isoelektrischen Reaktion der Ampholyte, können Salze zwischen diesen und den Nucleinsäuren gebildet werden. In dem Falle also, daß die Reaktion in den Zellen nie die für Salzbildung mit Ampholyten nötige Wasserstoffionenkonzentration erreichte, wäre man berechtigt, alle natürlichen Nucleoproteide als Salze zwischen basischen Eiweißstoffen und Nucleinsäuren zu definieren.

Ich will hier kurz erwähnen, daß ich Salze zwischen Thymonucleinsäure und Protamin dargestellt habe. Diese Arbeit ist noch nicht abgeschlossen, aber die Versuche haben gezeigt, daß lösliche Protaminsalze in derselben Weise wie die geschilderten Histonsalze herstellbar waren. Auch hier waren nur die Verbindungen mit mindestens zwei Natriumatomen mit einem Äquivalentgewicht Protamin und einem Molekül Nucleinsäure in Wasser löslich.

Schlußfolgerungen.

1. Ampholytsalze der Thymonucleinsäure werden bei fortschreitender Dialyse vollständig hydrolytisch gespalten, wenn das Ampholyt diffusibel ist.

2. Salze zwischen Thymonucleinsäure und Eiweiß mit der isoelektrischen Reaktion = p_H 4,7 existieren im Gleichgewicht mit Eiweiß als Fällungen bis in der nächsten Nähe des isoelektrischen Punktes, aber bei größerer Konzentration an dem Natriumsalz der Thymonucleinsäure sind die Salze schon bei kleineren Wasserstoffionenkonzentrationen als 3 bis $3{,}5 \cdot 10^{-3}$ in Wasser löslich.

3. Eiweiß mit dem isoelektrischen Punkte $p_H = 4{,}7$ wird innerhalb der beiden ersten Dissoziationsstufen der Thymonucleinsäure bei sinkender C_H mit größerer Geschwindigkeit gebunden als innerhalb der beiden letzten Dissoziationsstufen.

4. Neutrale Salze zwischen Thymonucleinsäure und di-Aminosäuren werden bei fortschreitender Dialyse schon bei Gegenwart von äußerst geringen Konzentrationen an Kochsalz unter doppelter Umsetzung gespalten, wobei das Natriumsalz der Nucleinsäure und das Chlorid der di-Aminosäure entstehen. Eine solche doppelte Umsetzung tritt wahrscheinlich bei Nucleohistonen ohne Dialyse bei sehr großen Kochsalzkonzentrationen ein und kann auch für saure Eiweißsalze der Nucleinsäure wahrscheinlich gemacht werden.

5. Histonsalze der Thymonucleinsäure sind wasserlöslich, wenn mindestens zwei Natriumatome mit einem basischen Äquivalent Histon und einem Molekül Thymonucleinsäure verbunden sind.

Der Verfasser erhielt zur Ausführung dieser Arbeit ein Stipendium aus *K.* und *A. Wallenbergs* Stiftung. Für diese großartige Unterstützung spreche ich hier dem Kuratorium meine Dankbarkeit aus.

Die Messungen der Ionenwirkungen auf die relative innere Reibung wurden im Carlsberg-Laboratorium ausgeführt, und ich benutze hier die Gelegenheit, Prof. *S. P. L. Sörensen* für sein Interesse und seine wertvollen Ratschläge zu danken. Ein großer Teil der Analysen ist von meiner Assistentin Frau *G. Hammarsten* ausgeführt worden.

Literatur.

1) *J. Sjöqvist*, Physiologisch-chemische Beobachtungen über die Salzsäure 1895. — 2) *S. P. L. Sörensen*, Proteinstudier, Meddelelser fra Carlsberg Laboratorium 1 bis 5, 1915—1917. — 3) *L. Michaelis*, Die Wasserstoffionenkonzentration, Teil I, 1922. — 4) *W. Pauli*, Physikalische Chemie der Eiweißstoffe, Teil I, 1920. — 5) *J. Loeb*, Proteins and the Theory of Colloidal Behavior 1922. — 6) *H. R. Procter*, Journ. Chem. Soc. **105**, 313, 1914. — 7) *H. R. Procter* and *J. A. Wilson*, ebendaselbst **109**, 307, 1916. — 8a) *Fr. Donnan*, Zeitschr. f. Elektrochem. **17**. — 8b) *Fr. Donnan* und *A. B. Harris*, Transact. of the Chem. Soc. Lond. **99**, 2, 1554, 1911. — 8c) *Fr. Donnan* und *G. M. Green*, Proc. Royal. Soc. Lnd. Ser. A, **90**, 450, 1914. — 8d) *Fr. Donnan* und *W. E. Garner*, Transact. of the Chem. Soc. Lond. **115**, 1313, 1919. — 9) *H. Steudel*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **48**, 402; **46**, 332; **49**, 406; **56**, 212. — 10) *R. Feulgen*, ebendaselbst **104**, 189, 1918—1919. — 11) *I. Bang*,

Beiträge zu chem. Phys. u. Pathol. **1**, 189; **4**, 115 und 362; **5**, 317. — 12) *Neumann*, Arch. f. (Anat. u.) Physiol. **22**, 374, 1898. — 13) *M. François*, C. r. d. Seances d. L'Acad. d. Sciences **144**, 1, 568, 1907. — 14) *A. Kossel* und *Fr. Kutscher*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **31**, 188, 1900. — 15) *A. Kossel*, ebendaselbst **22**, 178, 1896. — 16) *Woy*, Treadwells Lehrb. d. analyt. Chem. **2**, 372, 1917. — 17) *N. Bjerrum*, Zeitschr. f. anorg. u. allgem. Chem. **129**, 4, 323, Juli 1923; *P. Debye* u. *Hückel*, Phys. Zeitschr. **21**, 185, Mai 1923; *P. Debye*, ebendaselbst **24**, 334, August 1923. — 18) *H. Hammarsten*, Aus einer noch nicht publizierten Arbeit. — 19) *W. Ostwald*, Zeitschr. f. physikal. Chem. **2**, 841, 1888. — 20a) *W. Biltz* und *A. v. Vegesack*, ebendaselbst **68**, 357, 1909. — 20b) *Dieselben*, ebendaselbst **73**, 481, 1910. — 20c) *W. Biltz*, ebendaselbst **77**, 91, 1911. — 20d) *Derselbe*, ebendaselbst **83**, 625, 1913. — 21) *Bayliss*, Zeitschr. f. Chem. u. Ind. d. Kolloide **6**, 23. — 22) *Höber*, Physikal. Chem. d. Zelle und d. Gewebe, S. 268, 1914. — 23) *E.* und *H. Hammarsten*, Archiv för Kemi, Mineralogi och Geologi, Kungl. Svenska Vetensk. Akad. 8, 27. — 24) *M. Sobolew*, Prot. d. Kais. Mosk. Ges. f. Naturwissensch. usw., Nr. 46, 1895; Zeitschr. f. anorg. Chem. **12**, 16, 1896. — 25) *A. Rosenheim* und *F. Kohn*, Zeitschr. f. anorg. Chem. **69**, 247, 1911. — 26) *Abegg-Auerbach*, Handb. d. anorg. Chem. **4**, 829, 1921. — 27) *G. Hellgren* und *E. Jorpes*, diese Zeitschr. **144**, H. 5/6. — 28) *S. Arrhenius*, Zeitschr. f. physikal. Chem. **2**, 488, 1888. — 29) *H. de Vries*, ebendaselbst 2, 415, 1888. — 30) *F. Krafft* und *A. Stern*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **27**, 1747 und 1755; *F. Krafft* und *H. Wiglow*, ebendaselbst **28**, 2566, 1895; *F. Krafft*, ebendaselbst **29**, 2, 1328, 1896; *Derselbe*, ebendaselbst **29**, 2, 1334, 1896. — 31) *Moore* and *Parker*, The amer. Journ. of Physiol. **7**, 261, 1902. — 32) *R. Feulgen*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **91**, 165, 1914. — 33) *Derselbe*, Chemie und Physiol. d. Nucleinstoffe (Die Biologie in Einzeldarstellungen, *A. Kanitz* **5**), S. 284. — 34) *P. Della Valle*, Zeitschr. f. Chem. u. Ind. d. Kolloide **11—12**, 12, 1912—1913. — 35) *E. Hatschek*, ebendaselbst **11—12**, 238, 1912—1913. — 36) *E. Bottazi* und *G. d'Errico*, Pflügers Arch. f. Physiol. **115**, 359, 1906. — 37) *W. Jones*, Journ. of biol. Chem. **5**, 1. — 38) *W. Pauli*, diese Zeitschr. **70**, 489. — 39) *K. Rohde*, Pflügers Arch. f. Physiol. **168**, 411, 1917. — 40) *E. Hammarsten*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **109**, 141, 1920. — 41) *H. Steudel*, ebendaselbst **72**, 305; **73**, 471; **83**, 72. — 42) *Derselbe*, ebendaselbst **90**, 298. — 43) *Derselbe*, ebendaselbst 87, 207, 1913. — 44) *H. Steudel* und *E. Preiser*, ebendaselbst **122**, 298, 1922.

Zur Kenntnis der Proteine des Hafers.

Von

Heinrich Lüers und **Michael Siegert.**

(Aus der deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie und dem Universitätslaboratorium für angewandte Chemie in München.)

(Eingegangen am 23. November 1923.)

Während der Hafer vor dem Kriege fast ausschließlich als Viehfutter Verwendung fand, hat sich infolge der Knappheit an Nährmitteln während des Krieges eine große Umwandlung vollzogen, die Herstellung von Hafernährpräparaten für den menschlichen Genuß ist in ständigem Zunehmen begriffen. In Anbetracht ihres großen Nährwertes, ihrer Bekömmlichkeit und auch ihres Wohlgeschmacks werden die Haferpräparate besonders in der Kinderernährung immer mehr an Bedeutung und Wertschätzung gewinnen.

Merkwürdigerweise hat man bisher unter den hauptsächlichen Getreidearten dem Hafer in wissenschaftlicher Beziehung am wenigsten Beachtung geschenkt, insbesondere gilt dies von den Proteinen des Haferkorns. Es haben sich zwar namhafte Forscher wie *Ritthausen* und *Osborne* der Mühe unterzogen, die Proteine des Hafers zu isolieren und sie auf Grund ihrer Elementarzusammensetzung und der allgemeinen Eigenschaften in die Hauptgruppen der Albumine, Globuline und Gliadine einzureihen, aber Versuche, die erhaltenen Präparate nach einer der verschiedenen Abbaumethoden auf die sie zusammensetzenden Bausteine zu analysieren, wie dies an vielen anderen pflanzlichen Proteinen geschah, wurden bisher nicht unternommen.

Zweck der vorliegenden Arbeit war es, die wichtigsten, im Haferkorn vorkommenden Proteine darzustellen und sie auf Grund der hydrolytischen Abbauergebnisse untereinander, sowie mit den anderen schon untersuchten Pflanzeneiweißkörpern in Beziehung zu setzen.

I. Darstellung der Proteine des Hafers.

Nach *Osborne*[1]) enthält das Haferkorn drei genuine Proteine: ein alkohollösliches, ein salzlösliches und ein alkalilösliches Protein. Drei andere Proteine werden erhalten — offenbar durch eine Alteration

[1]) *V. Grießmayer*, Die Proteide der Getreidearten, S. 83, 1897.

der genuinen Proteine wahrscheinlich auf dem Wege einer Fermentwirkung —, wenn Hafermehl der Berührung mit Wasser oder gelösten Neutralsalzen ausgesetzt wird. Diese sekundären oder abgeleiteten Proteine zerfallen wie die genuinen in einen alkohollöslichen, einen salzlöslichen und einen alkalilöslichen Eiweißkörper.

Von den vielen von *Osborne* isolierten Präparaten wurden von uns folgende typische Vertreter dargestellt:

Osbornes Präparate 7, 8 und 12 für die Klasse der alkohollöslichen Proteine. Präparate 7 und 8 wurden direkt mit heißem Alkohol aus dem Mehl ausgezogen, Präparat 7 stellt die beim Kochen koagulierte Form dar, während Präparat 8 der nicht koagulierte Vertreter dieser Gruppe ist. Präparat 12 wurde nach vorangehender Behandlung des Mehles mit Wasser und Salzlösung durch Extraktion mit verdünntem Alkohol in der Kälte gewonnen. Es stellt also eines jener alterierten Proteine dar. Wir zogen es mit heran, um aus den Hydrolysenergebnissen den Beweis einer Veränderung der Zusammensetzung, wie sie *Osborne* auf Grund der Elementaranalyse gegenüber den durch direkte Alkoholextraktion gewonnenen Proteinen feststellte, erbringen zu können.

Ferner Präparate 13 und 20 als salzlösliche Globuline, wobei 13 das in der Kälte lösliche Präparat und 20 das durch Ausziehen mit 65° warmer 10proz. Kochsalzlösung erhaltene Präparat, genannt Avenalin, darstellt.

Präparat 16 endlich stellt den alkalilöslichen Vertreter der Haferproteine dar.

Für die sämtlichen Präparate diente Hafermehl als Ausgangsmaterial, das durch Mahlen von normalem Winterhafer und mehrfaches Sieben gewonnen war.

Präparate 7 und 8.

1 kg Mehl wurde mit 4 Litern Alkohol ($s = 0{,}915$) 1½ Stunden am Rückflußkühler gekocht. Der durch Abgießen und Abpressen gewonnene Extrakt wurde zur Extraktion eines neuen Kilogramm Mehls verwendet. Der klarfiltrierte, tief rotbraune Extrakt schied nach Einengen auf ein Drittel seines Volumens beim Abkühlen einen reichlichen Niederschlag aus, der durch Kochen mit 4 Litern Alkohol von 60 Proz. in etwa 4 Stunden sich wieder völlig löste. Nach Einengen auf die Hälfte und Abkühlen auf 35° hatte sich der Niederschlag wieder gebildet; er wurde nochmals in der gleichen Menge Alkohol gelöst und durch Abkühlen und Alkoholzusatz zur Abscheidung gebracht. Nach dem Abfiltrieren und Waschen mit absolutem Alkohol war der Körper nur mehr teilweise in 60proz. Alkohol löslich. Nach völliger Erschöpfung mit wässerigem Alkohol und Behandlung mit absolutem Alkohol und Äther resultierte nach Trocknung im Vakuum ein leichtes, bräunlich gelbes Pulver, *Präparat* 7, dessen Stickstoffgehalt 16,72 Proz. betrug.

Der lösliche Anteil wurde durch Einengen der Lösung auf die Hälfte und Abkühlenlassen erhalten. Nach gleicher Behandlung und Trocknung wie bei Präparat 7 resultierte ein im Aussehen rohem Gummi ähnliches Protein, das schließlich beim Verreiben ein leichtes graues Pulver von 17,76 Proz. Stickstoffgehalt darstellte. Dieses *Präparat 8* war noch völlig in Alkohol in der Wärme löslich.

Präparat 12.

3,5 kg Hafermehl wurden viermal mit Wasser und dreimal mit 10proz. Kochsalzlösung je 48 Stunden ausgezogen und der Rückstand dann zweimal mit 7 Litern Alkohol ($s = 0{,}90$) digeriert. Die vereinigten alkoholischen Auszüge schieden nach Einengung auf 1 Liter beim Abkühlen eine schmierige Masse und eine härtere braune Kruste an den Wänden des Kolbens ab. Nach Wiederlösen dieses Rückstandes in Alkohol und Filtration wurde die Lösung vom Alkohol durch Destillation befreit, die wässerige Emulsion in kaltes Wasser eingegossen, wobei ein teigiger, gelblicher Niederschlag entstand, der wiederholt in 60proz. Alkohol gelöst und wie vorhin zur Abscheidung gebracht wurde. Zuletzt wurde das Protein bis zum Verschwinden der Chlorreaktion mit Wasser gewaschen, mit absolutem Alkohol und Äther verrieben und im Vakuum getrocknet. Das leichte, gelbliche Pulver hatte einen Stickstoffgehalt von 13,31 Proz.

Präparate 13 und 20.

2,5 kg Hafermehl wurden zweimal mit je 8 Litern 10proz. kalter Kochsalzlösung 48 Stunden extrahiert, filtriert und die Filtrate mit Ammonsulfat gesättigt. Das ausgesalzene Protein wurde 11 Tage gegen Brunnenwasser dialysiert und der unlöslich gebliebene schwere Niederschlag mit Wasser, Alkohol, Äther gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die Darstellung dieses *Präparates 13* wurde genau nach den Angaben *Osbornes* viermal wiederholt und insgesamt 14,7 g mit einem durchschnittlichen Stickstoffgehalt von 13,42 Proz. erhalten, im Gegensatz zu *Osbornes* Präparat 13, das 16,95 Proz. N aufwies.

Zur Darstellung des *Präparates 20*, des Avenalins, wurden 2,5 kg Hafermehl mit 12 Litern 10proz. Kochsalzlösung bei 63 bis 65^0 1 Stunde digeriert, der Auszug durch einen Warmwassertrichter von der Temperatur 65 bis 70^0 filtriert und das klare Filtrat abgekühlt, wobei sich ein gelblicher, zusammenhängender Niederschlag abschied, von dem dekantiert werden konnte. Aus der Lösung konnte noch mit Ammonsulfat eine Nachausbeute gewonnen werden. Das Rohavenalin wurde nochmals in 10proz. NaCl-Lösung bei 65^0 gelöst, warm filtriert und das Filtrat sehr langsam abgekühlt. Das sich in Sphäroiden abscheidende Protein wurde bis zum Verschwinden der Chlorreaktion mit 50proz.

Alkohol, dann mit absolutem Alkohol und Äther gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das dichte, weiße Pulver hatte einen Stickstoffgehalt von 16,79 Proz.

Präparat 16.

2 kg Mehl wurden nach erschöpfender Extraktion mit verdünntem Alkohol und Abpressen mit 5,6 Litern 0,2proz. kalter Kalilauge digeriert, durch ein feines Sieb geschlagen, nach 24 Stunden dekantiert und die mehrfach filtrierte Lösung mit Essigsäure gefällt. Der abfiltrierte, mit Alkohol gewaschene Niederschlag wurde in 0,2proz. KOH gelöst, die Trübung mit Kochsalz gefällt und innerhalb einer Woche (Thymolzusatz!) blank filtriert. Die täglich erhaltenen Filtrate wurden mit Essigsäure gefällt, die Niederschläge mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschen und getrocknet. Das dichte, weißlichgraue Pulver (4,3 g) hatte einen Stickstoffgehalt von 15,84 Proz.

II. Hydrolyse der Haferproteine.

Nachdem von den einzelnen Proteinen nach ihrer Reinigung jeweils nur kleine Mengen (4 bis 20 g) erhalten wurden, kam als Hydrolysenmethode nur das *van Slyke*sche Verfahren in Betracht. Es erübrigt sich, das Verfahren näher zu beschreiben, nachdem es in anderen Mitteilungen[1]) bereits ausführlich behandelt wurde. Um für jedes Präparat noch eine Kontrollhydrolyse durchführen zu können, reichten oftmals die zur Verfügung stehenden Mengen nicht aus. Es wurde deshalb nach einem von *Lüers* und *Landauer*[2]) mitgeteilten, abgekürzten Verfahren gearbeitet, das gestattet, eine exakte Hydrolyse noch mit 0,8 bis 1,0 g durchzuführen. Die auf diese Weise erhaltenen Werte stimmten mit den Ergebnissen der ausführlichen Hydrolyse innerhalb der Fehlergrenzen überein. Die Hydrolysenresultate aller dargestellten Haferproteine finden sich in den Versuchsprotokollen S. 474 u. 475 der Arbeit übersichtlich zusammengestellt.

Osborne faßt in seiner Übersicht über die Proteine des Haferkorns seine auf der Elementaranalyse und den allgemeinen Eigenschaften fußenden Ergebnisse folgendermaßen zusammen:

1. Durch Kochen einer Lösung von Präparat 8 in verdünntem Alkohol erfolgt Gerinnung eines Eiweißkörpers. Das koagulierte Protein — Präparat 7 — ist in Alkohol unlöslich, in seiner Zusammensetzung aber anscheinend dem Präparat 8 gleich. Präparat 7 und 8 sind ausgezeichnet durch ihren ausnehmend hohen Schwefelgehalt, der unter den Proteinen nur durch den des Keratins noch übertroffen wird.

2. Die Proteine des Hafers erleiden große Umwandlungen in Berührung mit Wasser und Kochsalzlösung. Das Präparat, das man durch direkte Behandlung des gemahlenen Hafers mit Alkohol auszieht — Präparat 7

[1]) Diese Zeitschr. **96**, 117, 1919; **133**, 604, 1922.

[2]) Ebendaselbst **133**, 601, 1922.

und 8 —, unterscheidet sich in Eigenschaften und Zusammensetzung stark von jenem, das man erst nach vorhergehender Behandlung des Mehles mit Wasser und Kochsalzlösung durch Alkoholauszüge gewinnt (Präparat 12).

3. Das bei 65° mit 10proz. Salzlösung ausgezogene Avenalin (Präparat 20) unterscheidet sich in Zusammensetzung und Eigenschaften von dem mit 10proz. Salzlake bei 20° gewonnenen Globulin (Präparat 13).

4. Das Produkt, welches durch verdünnte Kalilauge ausgezogen wird (Präparat 16), hat nahezu dieselbe Zusammensetzung wie das Globulin, das direkt mit Salzlösung erhalten wird (Präparat 13).

Die Ergebnisse unserer Hydrolysen bestätigten für Punkt 1, 2 und 3 völlig die Angaben *Osbornes*.

1. Es ist durch die Hydrolyse erwiesen, daß Präparate 7 und 8 ihrer Zusammensetzung nach ein und dasselbe Protein darstellen.

Tabelle I. Identität von Präparat 7 und 8.

	Präparat 7 Proz.	Präparat 8 Proz.
Ammoniak-N	21,83	21,79
Melanin-N	1,19	1,17
Cystin-N	8,77	8,66
Arginin-N	6,53	6,20
Histidin-N	2,15	2,42
Lysin-N	0,15	0,22
Amino-N im Basenfiltrat	51,55	52,20
Nicht-Amino-N im Basenfiltrat	10,98	11,03

Die Tabelle erweist, daß die Verteilung des Stickstoffs innerhalb der Fehlergrenzen in beiden Präparaten die gleiche ist. Auch ließ sich durch die Cystinbestimmung im Hydrolysengemisch nachweisen, daß dieses alkohollösliche Protein des Hafers hinsichtlich seines Schwefelgehaltes alle anderen pflanzlichen Eiweißkörper weit übertrifft, wie folgende Zusammenstellung zeigt:

Tabelle II. Cystingehalt der pflanzlichen Eiweißkörper und des Keratins.

Gliadin	1,25 Proz.	[1]
Edestin	1,49 „	[1]
Leucosin	1,49 „	[2]
Hordein-Bynin	1,58 „	[3]
Präparat 7	3,77 „	
Präparat 8	3,66 „	
Keratin	6,60 „	[1]

2. Präparat 12, das durch Behandlung des Mehles mit Wasser und Kochsalz umgewandelte Protein, weicht auch durch die Ergebnisse der Hydrolyse sowohl hinsichtlich des Ammoniak-N als auch im Hexonbasen-N — hier besonders im Cystingehalt — sehr erheblich vom entsprechenden genuinen Protein ab, wie Tabelle III zeigt.

[1]) *Abderhalden*, Handb. d. biochem. Arbeitsmethod. 1912, V_2, S. 1026.
[2]) *Lüers* und *Landauer*, diese Zeitschr. **133**, 598, 1922.
[3]) *Lüers*, ebendaselbst **96**, 117, 1919.

Tabelle III.

Umwandlung des alkohollöslichen Proteins durch vorhergehende Behandlung mit Wasser und Salzlösung.

	Präparat 8 Proz.	Präparat 12 Proz.
Ammoniak-N	21,79	18,89
Melanin-N	1,17	1,21
Cystin-N	8,66	1,79
Arginin-N	6,20	9,17
Histidin-N	2,42	3,58
Lysin-N	0,22	0,17
Amino-N im Basenfiltrat	52,35	51,81
Nicht-Amino-N im Basenfiltrat	10,74	11,79

Es bestätigt sich somit *Osbornes* Ansicht, daß die Eiweißkörper des Hafers durch Behandlung des Mehles mit Wasser und Salzlösung eine Veränderung ihrer Zusammensetzung erleiden.

3. Die durch Ausziehen des Mehles mit Salzlösung bei verschiedenen Temperaturen gewonnenen Präparate 13 und 20 kennzeichnen sich auf Grund der Hydrolyse als zwei verschiedene Globuline.

Tabelle IV.

Präparate 13 und 20 (Avenalin) sind zwei verschiedene Globuline.

	Präparat 13 löslich bei 18° Proz.	Präparat 20 löslich bei 65° Proz.
Ammoniak-N	9,67	14,08
Melanin-N	2,65	0,95
Cystin-N	1,40	0,98
Arginin-N	10,85	15,04
Histidin-N	3,30	8,35
Lysin-N	4,73	3,54
Amino-N im Basenfiltrat	54,35	52,16
Nicht-Amino-N im Basenfiltrat	11,99	3,87

Was nun Punkt 4 der *Osborne*schen Zusammenfassung anbelangt, wonach Präparat 13 und das alkalilösliche Präparat 16 sehr ähnlich sein sollten, führte das Hydrolysenergebnis hier zu einem entgegengesetzten Resultat. Die Werte weichen so erheblich voneinander ab, daß hier wohl zwei verschiedene Proteine vorliegen müssen.

Dagegen ist eine große Ähnlichkeit dieses Präparates 16 mit dem Avenalin (Präparat 20) nicht zu verkennen, wenigstens stimmt der Ammoniak-, Arginin-, Lysin-, Histidin- und der Stickstoff im Basenfiltrat der beiden Proteinen leidlich überein.

Tabelle V. Verschiedenheit von Präparat 13 und 16.

	Präparat 13 Proz.	Präparat 16 Proz.
Ammoniak-N	9,67	12,19
Melanin-N	2,65	2,89
Cystin-N	1,40	1,52
Arginin-N	10,85	14,43
Histidin-N	3,30	7,24
Lysin-N	4,73	4,39
Amino-N im Basenfiltrat . . .	54,35	52,35
Nicht-Amino-N im Basenfiltrat .	11,99	4,08

Es scheint unser durch Extraktion des Mehles mit kalter Salzlösung gewonnenes Präparat 13 nicht mit dem *Osborne*schen identisch zu sein. Es gelang uns trotz viermaliger Wiederholung der Darstellung niemals, ein Protein von 16 Proz. N, sondern nur ein solches mit durchschnittlich 13,4 Proz. zu erhalten. Auch war es nach der Dialyse im Gegensatz zu *Osborne* in 10proz. Salzlösung, selbst nach Sodazusatz, nicht mehr löslich. Wir neigen der Ansicht zu, daß wahrscheinlich im Hafer ähnliche Verhältnisse wie beim Legumin[1]) der Erbse vorliegen, das in einer löslichen a- und einer unlöslichen b-Form auftreten kann. Das von uns erhaltene Präparat 13 stellt die unlösliche Form dar.

Vergleich der Haferproteine mit anderen Cerealienproteinen.

Von besonderem Interesse ist ein Vergleich der alkohollöslichen Proteine des Hafers (Präparate 7 und 8) mit den alkohollöslichen Proteinen der Gerste und des Weizens, dem Hordein und dem Gliadin. Sie weisen sehr große Ähnlichkeiten miteinander auf, ohne allerdings völlig übereinzustimmen. Der hohe Gehalt an Ammoniakstickstoff, den wir in Säureamidbindung anzunehmen haben, ist allen dreien eigen. Auch stimmt der Amino- und Nicht-Amino-N im Basenfiltrat bei allen gut überein. In der Hexonbasengruppe fällt bei allen der sehr geringe Lysingehalt auf, der diese Proteine vom ernährungsphysiologischen Standpunkt aus nicht vollwertig erscheinen läßt, wie zahlreiche Tierversuche besonders amerikanischer Forscher bewiesen.

Dagegen liegt ein Hauptunterschied des alkohollöslichen Haferproteins gegenüber dem Gliadin und Hordein in dem auffallend hohen Cystingehalt und dem mittleren Histidinanteil.

Auch beim Vergleich des Haferglobulins (Präparat 13) mit dem Globulin des Weizens und der Gerste (Edestin) ergeben sich Ähnlichkeiten und wieder Unterschiede. Während der Ammoniak-N nahe übereinstimmt, fällt besonders der viel niedrigere Arginin- und der bedeutend höhere Nicht-Amino-N im Basenfiltrat beim Haferglobulin auf.

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **102**, 92, 1918.

Versu

van Slyke-Hydroly

	Präparat 7	Präparat 8
Volumen der Hydrolysenlösung in ccm	200	200
Hierin Gesamt-N	0,391 39	0,400 48
Ammoniak-N	0,085 34	0,087 27
oder in Proz. des Gesamt-N	21,83	21,79
Melanin-N	0,004 65	0,004 71
oder in Proz. des Gesamt-N	1,19	1,18
Hexonbasen. Volumen der Lösung = 150 ccm Urlösung	50	50
Arginin-N in 50 ccm = 150 ccm Urlösung	0,018 66	0,017 75
oder Arginin-N in 200 ccm Hydrolysenlösung	0,024 88	0,023 66
Davon ab 17 Proz. des Cystins	0,002 06	0,002 05
Dazu Löslichkeitskorrektur	0,003 2	0,003 2
Arginin-N = Proz. des Gesamt-N	0,026 02 = 6,53 Proz.	0,024 81 = 6,20 Pr
Cystin-N in 150 ccm Urlösung	0,009 12	0,009 03
In 200 ccm Hydrolysenlösung	0,012 14	0,012 04
Dazu Löslichkeitskorrektur	0,002 6	0,002 6
Cystin-N = Proz. des Gesamt-N	0,014 74 = 3,77 Proz.	0,014 64 = 3,66 Pr
Total-N der Basen in 150 ccm Urlösung	0,029 87	0,029 96
oder in 200 ccm Hydrolysenlösung	0,039 83	0,039 95
Amino-N der Basen in 200 ccm Hydrolysenlösung	0,019 65	0,019 91
Total-N — Amino-N = *D* in 200 ccm Urlösung	0,020 18	0,020 04
Histidin-N = 1,5 . *D* — 1,125 Arginin In 200 ccm Hydrolysenlösung	0,004 6	0,005 73
Dazu Löslichkeitskorrektur	0,003 8	0,003 8
Histidin-N = Proz. des Gesamt-N	0,008 4 = 2,15 Proz.	0,009 53 = 2,42 Pr
Total-N — [Arginin + Cystin + Histidin-N] in 200 ccm Hydrolysenlösung	0,000 27	0,000 57
Dazu Löslichkeitskorrektur	0,000 5	0,000 5
Lysin-N = Proz. des Gesamt-N	0,000 77 = 0,15 Proz.	0,001 07 = 0,22 Pr
Volumen des Basenfiltrats entsprechend 150 ccm Urlösung	200	200
Total-N in 200 ccm Hydrolysenlösung	0,254 89	0,262 31
Amino-N in 200 ccm Hydrolysenlösung	0,206 99	0,214 38
Davon ab Löslichkeitskorrektur	0,005 2	0,005 2
Amino-N im Basenfiltrat = Proz. des Gesamt-N	0,201 79 = 51,55 Proz.	0,209 18 = 52,35 Pr
Nicht-Amino-N im Basenfiltrat = Total-N — Amino-N in 200 ccm Hydrolysenlösung	0,047 90	0,047 93
Davon ab Löslichkeitskorrektur	0,004 9	0,004 9
Nicht-Amino-N = Proz. des Gesamt-N	0,043 00 = 10,98 Proz.	0,043 03 = 10,74 Pr

tokolle.

Haferproteine.

Präparat 12	Präparat 13	Präparat 16	Präparat 20
200	200	200	200
,242 59	0,285 73	0,350 36	0,388 55
,064 64	0,027 64	0,042 60	0,054 72
,89	9,67	12,19	14,08
,004 16	0,007 58	0,009 19	0,003 68
,21	2,65	2,89	0,95
50	50	50	50
,023 1	0,020 87	0,035 87	0,041 42
,030 8	0,027 84	0,047 82	0,055 23
,000 06	0,000 24	0,000 46	0,000 02
,003 2	0,003 2	0,003 2	0,003 2
,033 94 = 9,18 Proz.	0,030 8 = 10,25 Proz.	0,050 56 = 14,43 Proz.	0,058 41 = 15,04 Proz.
,002 67	0,001 077	0,001 95	0,000 9
,003 56	0,001 43	0,002 73	0,001 2
,002 6	0,002 6	0,002 6	0,002 6
,006 16 = 1,79 Proz.	0,004 03 = 1,40 Proz.	0,005 33 = 1,52 Proz.	0,003 8 = 0,98 Proz.
,032 05	0,036 23	0,064 07	0,072 92
,042 83	0,048 31	0,085 42	0,097 23
,013 91	0,023 69	0,036 27	0,036 716
,028 92	0,024 62	0,049 15	0,060 51
,008 50	0,005 9	0,021 57	0,028 66
,003 8	0,003 8	0,003 8	0,003 8
,012 30 = 3,58 Proz.	0,009 7 = 3,30 Proz.	0,025 37 = 7,24 Proz.	0,032 46 = 8,35 Proz.
,000 03	0,013 38	0,013 76	0,012 16
,000 5	0,000 5	0,000 5	0,000 5
,000 53 = 0,17 Proz.	0,013 88 = 4,75 Proz.	0,014 26 = 4,39 Proz.	0,012 66 = 3,41 Proz.
200	200	200	200
,222 79	0,199 57	0,207 73	0,227 81
,177 49	0,160 45	0,188 60	0,207 87
,005 2	0,005 2	0,005 2	0,005 2
,172 29 = 51,81 Proz.	0,155 25 = 54,35 Proz.	0,183 40 = 52,35 Proz.	0,202 67 = 52,16 Proz.
,045 3	0,039 12	0,019 13	0,019 94
,004 9	0,004 9	0,004 9	0,004 9
,040 4 = 11,79 Proz.	0,034 22 = 11,99 Proz.	0,014 23 = 4,08 Proz.	0,015 04 = 3,87 Proz.

Das Avenalin, ein durch seine Löslichkeit in heißer Salzlösung ausgezeichnetes, nur für den Hafer charakteristisches Protein, nimmt eine Mittelstellung zwischen dem Globulin des Hafers und dem Edestin ein. In der Hexonbasengruppe zeichnet es sich durch hohen Arginin- und Histidingehalt aus.

Es zeigen sich somit in manchen Fällen unverkennbare Analogien, nirgends aber völlige Übereinstimmung. Es charakterisieren sich daher die Proteine des Hafers als Körper von selbständiger Art.

Tabelle VI.

Vergleich der Haferproteine mit anderen Cerealienproteinen.

	Ammoniak-N	Melanin-N	Cystin-N	Arginin-N	Histidin-N	Lysin-N	Amino-N im Basenfiltrat	Nicht-Amino-N im Basenfiltrat
Gliadin	25,02	0,86	1,25	5,71	5,20	0,75	51,98	8,50
Hordein	23,00	1,70	1,58	5,00	0,93	0,18	53,85	12,49
Präparat 7	21,83	1,19	3,77	6,53	2,15	0,15	51,55	10,98
„ 8	21,79	1,18	3,66	6,20	2,42	0,22	52,35	10,74
Edestin	9,99	1,98	1,49	27,05	5,75	3,86	47,55	1,70
Präparat 13	9,67	2,65	1,40	10,85	3,30	4,73	54,35	11,99
„ 16	12,19	2,89	1,52	14,43	7,24	4,39	52,35	4,08
„ 20 (Avenalin)	14,08	0,95	0,98	15,04	8,35	3,54	52,16	3,87

Abgekürzte Hydrolysen der Haferproteine.

	8	12	13	16	20
Gesamt-N in 100 ccm Hydrolysenlösung	0,10958	0,23552	0,17232	0,15455	0,13909
Ammoniak-N in 100 ccm Hydrolysenlösung	0,02343	0,04487	0,01555	0,01844	0,02830
Oder in Proz. des Gesamt-N .	21,41	19,05	9,07	12,05	14,08
Melanin-N in 100 ccm Hydrolysenlösung	0,00014	0,00314	0,00438	0,00355	0,00170
Oder in Proz. des Gesamt-N .	1,29	1,33	2,55	2,30	0,86
Gesamt-Hexonbasen-N in 100 ccm Hydrolysenlösung	0,00865	0,02972	0,02740	0,03821	0,04803
Dazu Löslichkeitskorrekt. für Volumen 100 ccm	0,00505	0,00505	0,00505	0,00505	0,00505
Oder in Proz. des Geasmt-N .	12,46	14,87	19,2	28,01	27,38
Amino-N im Basenfiltrat in 100 ccm Hydrolysenlösung	0,05903	0,12404	0,0965	0,08265	0,10408
Hiervon ab Löslichkeitskorr. für Volumen 100 ccm . . .	0,0026	0,0026	0,0026	0,0026	0,0026
Oder in Proz. des Gesamt-N .	52,06	51,18	54,77	51,82	52,57
Gesamt-N im Basenfiltrat in 100 ccm Hydrolysenlösung .	0,0746	0,1534	0,12077	0,09203	0,11349
Differenz Gesamt-N-Amino-N = Nichtamino-N	0,01554	0,02936	0,02427	0,00938	0,00941
Hiervon ab Löslichkeitskorr.	0,00245	0,00245	0,00245	0,00245	0,00245
Oder in Proz. des Gesamt-N .	11,32	11,9	12,73	4,48	4,91

Cholesterin- und Bicarbonatgehalt des Blutes im Verlaufe experimenteller Nierenerkrankungen.

Von

A. Stasiak.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Budapest.)

(Eingegangen am 23. November 1923.)

Von klinischer Seite ist es ein bereits des öfteren gebrachter Befund, daß Nierenerkrankungen charakteristische Veränderungen im Lipoid-, besonders Cholesteringehalt des Blutes verursachen. *Bloor*, *Stepp*, *Port*, *Hahn* und *Wolff*, *Beumer*, *Gross*, *Strauss* und *Schubard* und andere Autoren konnten es mit ihren Untersuchungen wiederholt bestätigen, daß die Nephrosen, also die lipoiden Degenerationen der Nieren, es sind, welche mit hohem Blutcholesterin einhergehen, hingegen die glomerulären Nephritiden meist normale Werte zeigen. Die auch bei letzteren vorkommenden höheren Cholesterinwerte sollen immer mit einem „nephrotischen Einschlag" im Sinne *Vollhard* und *Fahrs* einhergehen.

Als Ursache der Hypercholesterinämie wird von mehreren Autoren [*Stepp* (1), *Beumer* (2), *Bloor* (3) u. a.] eine fettige Degeneration der Niere angenommen, in deren Folge die Lipoide der zerfallenden Zellen in höheren Massen an das Blut abgegeben werden. Außer diesem Ursprung meinen *Bloor* (4), *Epstein* und *Rothschild* (5) auch eine Störung des Fett- und Lipoid-Cholesterinstoffwechsels annehmen zu können, welche die Hypercholesterinämie verursachen soll. *Bloor* denkt nämlich an eine Störung der Verbrennung der Fette und Lipoide, hervorgerufen durch die bei Nierenkrankheiten auftretende Acidose.

Zweck folgender Untersuchungen war, einesteils das Verhalten des Blutcholesterins zu prüfen während des Verlaufs verschiedener, experimentell hervorgerufener Nierenschädigungen, anderenteils sollten gleichzeitig auch die Aciditätsverhältnisse des Blutes geprüft werden, um dadurch einen eventuellen Zusammenhang zwischen Blutcholesterin und Acidose feststellen zu können.

Als Versuchstiere dienten Hunde, bei denen eine Schädigung der Niere durch Cantharidin, Urannitrat und Sublimat hervorgerufen wurde. Um einen alimentären Einfluß der Fette und Lipoide möglichst ausschließen zu können, wurden die Tiere während der Versuche hauptsächlich mit Brot gefüttert. Die Blutentnahme geschah durch Punktion der V. femoralis.

Das Cholesterin wurde als Gesamtcholesterin im Serum nach *Bloors* (6) Methode bestimmt, mit der Abweichung, daß nicht 2 ccm Serum auf 100 ccm Alkohol-Äthergemisch verwandt wurden, sondern bloß 0,5 ccm Serum auf 25 ccm Alkohol-Äthergemisch. Auf diese Weise gewonnene Werte waren dieselben wie die des ursprünglichen Verfahrens und hatten den Vorteil, mit viel weniger Blut auszukommen.

Um in die Aciditätsverhältnisse Einblick zu gewinnen, wurde der Bicarbonatgehalt des Oxalatplasmas nach der *van Slyke*schen (7) Methode bestimmt. Die Blutproben zu diesen Bestimmungen wurden gleichfalls der V. femoralis entnommen, doch wurden sie sofort in ein Zentrifugenröhrchen unter Paraffinum liquidum aufgefangen.

Vorerst wurden an normalen Hunden die Cholesterin- und Bicarbonatwerte ermittelt. Für Cholesterin fand ich die Werte zwischen 0,098 und 0,130 Proz. für 100 mg Serum berechnet. Ähnliche, kaum etwas höhere Werte gibt auch *Stepp* (8) an. Die als Bicarbonat gebundene Kohlensäure, nach *van Slyke* für 100 ccm Plasma berechnet, ergab 51,11 bis 61,93 Vol.-Proz.

Zwecks Raumersparnis will ich nur je einen Fall tabellarisch wiedergeben.

Tabelle I.

Hund 1. Körpergewicht 7 kg. 4. Oktober 1923. 10 mg Cantharidin. kryst. in Äther aceticus gelöst, subkutan injiziert.

Tag	CO_2 Vol.-Proz.	Cholesterin Proz.	Harnbefund
5. X.	48,50	0,249	*Esbach*: 3/4 Prom. Erythrocyten
6. X.	48,75	0,163	„ 3/4 „ „
8. X.	60,99	0,230	Eiweiß: Spuren. Sediment: θ
10. X.	61,30	0,148	
12. X.	—	0,240	Eiweiß: θ. Sediment: θ
15. X.	—	0,290	„ θ „ θ
17. X.	—	0,190	„ θ „ θ
20. X.	—	0,174	„ θ „ θ

Aus Tabelle I ergibt sich, daß der Cholesteringehalt des Blutes während des Verlaufs der Krankheit stets erhöht ist. Der Cholesteringehalt ist nicht konstant, zeigt erhebliche Schwankungen, und die höchsten Cholesterinwerte fallen nicht zusammen mit dem schwersten Urinbefund. Im Gegenteil, der höchste Wert, 0,290 Proz., findet sich am 15. Oktober, nachdem der Urin bereits seit einigen Tagen weder Eiweiß noch pathologische Formelemente aufwies. Was die Acidose anbelangt, so fanden sich bloß am zweiten und dritten Tage nach der Vergiftung acidotische Werte, um bereits vom vierten Tage an normalen Werten Platz zu geben. Es zeigt sich keine Übereinstimmung im Grade

der Hypercholesterinämie und der Acidose, da bei 48,75 Vol.-Proz. CO_2 ein Cholesterinwert von 0,163 Proz. bestand, hingegen bei normalen Aciditätsverhältnissen das Cholesterin viel höhere Werte zeigt. Auffallend ist, daß die Hypercholesterinämie auch dann noch besteht, wenn die Krankheit, nach dem Harnbefunde geurteilt, bereits geheilt ist; so findet sich noch ein Cholesterinwert 0,174 Proz. am zehnten Tage nach dem ersten normalen Harnbefund. Ähnlich berichtet auch *Beumer* (2), der bei Kindern noch hohe Cholesterinwerte fand, als der Harn nur noch wenig Eiweiß enthielt und sonstige Krankheitserscheinungen nicht mehr bestanden.

Bemerkt sei auch, daß die Schädigung des Cantharidins als eine glomeruläre Läsion (9) aufgefaßt wird, so daß man, im Anschluß an klinische Fälle der glomerulären Nierenerkrankungen, auch hier niedrige Werte erwartet hätte. Allerdings besteht die Wahrscheinlichkeit, daß man bei experimentellen Nierenschädigungen nie ganz bestimmt lokalisierte Läsionen erreichen kann, und so ist wohl im Falle des Cantharidins, wenn auch hauptsächlich eine glomeruläre Läsion besteht, eine Schädigung des tubulären Apparates nicht auszuschließen. Außerdem kann das Cantharidin auch in anderen Organen eine lipoide Degeneration hervorrufen, so daß nicht nur aus der Niere, sondern auch aus anderen zerfallenden Zellen Lipoide in die Blutbahn gelangen und das Blutcholesterin vermehren können.

Zwei weitere mit Cantharidin vergiftete Hunde zeigten ähnliche Verhältnisse wie Hund 1. Bei Hund 2 fand sich als höchster Cholesterinwert 0,315 Proz. am dritten Tage der Erkrankung, weiterhin bestanden Werte von 0,190 bis 0,230 Proz., denen vom zehnten Tage nach der Injektion normale Werte folgten: 0,120 bis 0,145. Bei diesem Falle kehrte der Cholesterinwert zur Norm zurück, bevor noch die Albuminurie verschwand. Hund 3 gab als höchsten Wert 0,330 Proz. am vierten Tage der Erkrankung, die Hypercholesterinämie (0,200 bis 0,270 Proz.) bestand noch, als bereits der Harnbefund seit 8 Tagen normal war. Die Aciditätsverhältnisse kehrten binnen der ersten 3 bis 4 Tage zur Norm zurück. Tabelle II.

In diesem Falle einer Schädigung der Niere durch Urannitrat blieben die Bicarbonatwerte des Blutes normal, das Cholesterin zeigt sehr schwankende, über dem Normalwert stehende Werte. Nachdem die pathologischen Formelemente aus dem Harn verschwanden und nur noch Spuren von Eiweiß nachweisbar waren, sinkt auch der Cholesterinwert zur Norm.

Die erhöhten Cholesterinwerte können auch hier auf eine tubuläre Läsion bezogen werden, denn im Harnsediment fanden sich neben zahlreichen Erythrocyten auch viele granulierte Cylinder und Epithelzellen.

Tabelle II.

Hund 5. Körpergewicht 8,2 kg. 12. Juli. 16 mg Urannitrat, subkutan.

Tag	CO_2 Vol.-Proz.	Cholesterin Proz.	Harnbefund
13. VII.	52,5	0,168	*Esbach*: 1 Prom. Sediment: viele Erythrocyten u. gran. Cylinder
15. VII.	51,15	0,200	*Esbach*: 1 Prom. Sediment: viele Erythrocyten u. gran. Cylinder
16. VII.	—	0,142	
17. VII.	54,20	0,150	*Esbach*: 1,5 Prom. Sediment: unverändert
20. VII.	55,6	0,200	
23. VII.	—	0,205	Sediment: einzelne gran. Cylinder und Erythrocyten
24. VII.	—	0,195	
26. VII.	—	0,157	
28. VII.	—	0,205	Eiweiß: Spuren. Sed.: unveränd.
30. VII.	—	0,160	„ „ „
3. VIII.	—	0,125	„ Spur. Sediment: θ
6. VIII.	—	0,145	„ „ „ θ

Schließlich sei auch noch ein Versuch mit Sublimat tabellarisch mitgeteilt.

Tabelle III.

Hund 4. Körpergewicht 8,5 kg. 23. Juli. 17 mg Sublimat intravenös injiziert.

Tag	CO_2 Vol.-Proz.	Cholesterin Proz.	Harnbefund
25. VII.	45,27	0,180	*Esbach*: 2,5 Prom. Sediment: einige gran. Cylinder
27. VII.	57,18	0,135	*Esbach*: 0,5 Prom. Sediment: viele Erythrocythen, einige gran. Cylinder
28. VII.	55,34	0,120	*Esbach*: 0,5 Prom. Sediment: viele Erythrocythen, einige gran. Cylinder
30. VII.	58,74	0,157	Eiweiß: Spuren. Sediment: θ
1. VIII.	—	0,158	„ θ. Sediment: θ.
3. VIII.	—	0,145	
4. VIII.	—	0,170	
6. VIII.	—	0,175	„ θ.
8. VIII.	—	0,145	
10. VIII.	—	0,175	
13. VIII.	—	0,172	„ θ.
16. VIII.	—	0,172	

Obzwar die Läsion mit Sublimat als Nephrose betrachtet wird, so zeigen hier die Cholesterinwerte eine relativ kleine Erhöhung über die normalen. Acidose besteht bloß am zweiten Tage, danach finden sich normale Werte.

Nachdem zwei Monate verstrichen sind und Hund 4 ganz normale Harnbefunde zeigte, wurde derselbe Versuch wiederholt, und der Hund mit derselben Dose Sublimat vergiftet wie zum erstenmal. Diesmal fanden sich nun sehr hohe Cholesterinwerte. Am vierten Tage nach

der Sublimatinjektion war das Cholesterin 0,400 Proz.; nach 2 Tagen sank es auf 0,230 Proz., im Harn fanden sich da bloß Spuren Eiweiß und keine pathologischen Formelemente mehr. Die Hypercholesterinämie konnte noch nach weiteren 10 Tagen auch beobachtet werden.

Da die tubuläre Läsion bei Sublimatvergiftung als unbezweifelt zu betrachten ist, scheint der in Tabelle III angeführte Versuch darauf hinzuweisen, daß auch tubuläre Schädigungen der Niere vorkommen können, ohne mit Sicherheit eine ausgesprochene Hypercholesterinämie zur Folge zu haben.

Die *Ergebnisse* der mitgeteilten Versuche sind folgende:

1. Experimentelle Nierenerkrankungen, seien dieselben durch Cantharidin, Urannitrat oder Sublimat verursacht, zeigen alle eine mehr oder weniger beträchtliche Hypercholesterinämie.

2. Da die Versuchstiere fett- und cholesterinfrei ernährt wurden, so sprechen auch diese Versuche daneben, daß die Hypercholesterinämie bei Nierenerkrankungen nicht alimentär bedingt ist [*Beumer* (2)].

3. Die Hypercholesterinämie scheint nicht die Folge einer durch Acidose bedingten Störung des Fett- und Lipoidstoffwechsels zu sein, da der Bicarbonatgehalt des Blutes, welcher als Indikator der Aciditätsverhältnisse im Organismus zu betrachten ist, viel früher normale Werte zeigt, bevor noch die Hypercholesterinämie abgeklungen wäre.

4. Da die Hypercholesterinämie auch dann noch bestehen kann, wenn, nach dem Harnbefund geurteilt, in der Niere schon eine Reparation zustande gekommen ist, so dürfte vielleicht angenommen werden, daß die Gifte nicht nur die Nierenzellen schädigen, sondern auch anderwärts eine lipoide Degeneration verursachen, von deren Grad und Dauer abhängend der Cholesteringehalt des Blutes, unabhängend von der Niere, über kürzere oder längere Zeit beeinflußt werden kann.

Literatur.

1) *Stepp*, Münch. med. Wochenschr. S. 781, 1918 und Deutsch. Arch. f. klin. Med. **127**. — 2) *Beumer*, Arch. f. Kinderheilk. **68**, 105, 1920. — 3) *Bloor*, Journ. of biol. Chem. **49**, 201, 1921. — 4) *Derselbe*, ebendaselbst **31**, 575, 1917. — 5) *Epstein* und *Rothschild*, ebendaselbst **29**, IV, 1917. — 6) *Bloor*, ebendaselbst **24**, 227, 1916. — 7) *Van Slyke*, ebendaselbst **30**, 307, 1917. — 8) *Stepp*, Zeitschr. f. Biol. **69**, 514, 1919. — 9) *Meyer* und *Gottlieb*, Exper. Pharmakol., VI. Aufl., 1922.

Über den Einfluß von Kolloiden auf Fermente. III.

Von

Jitsuichi Hagihara.

(Aus der biochemischen Abteilung des städtischen Krankenhauses am Urban, Berlin.)

(Eingegangen am 23. November 1923.)

In einer vorangehenden Abhandlung (1) habe ich den Einfluß von Lecithin und Cholesterin auf Diastase geprüft. Es interessierte, die Wirkung der beiden „Lipoide" auf die Trypsinwirkung ebenfalls zu untersuchen. Die bisherigen Angaben hierüber sind durchaus nicht einheitlich, was wahrscheinlich zum großen Teil an den Versuchsbedingungen liegt. Es lag die Möglichkeit vor, daß die Wirkung der genannten Substanzen zum mindesten teilweise von der Reaktion abhinge: diese spielt ja bekanntermaßen auch eine bedeutende Rolle bei der Methodik *Willstätters* zur präparativen Trennung der verschiedenen Fermente. Ich verwendete für meine Versuche das Pankreatinpräparat der chemischen Fabrik Rhenania, Aachen, das zweifellos nicht rein ist und besonders auch die anderen Fermente des Pankreas, Lipase und Diastase, enthält. Es war unter diesen Umständen denkbar, daß durch Adsorption der Lipase an das Lipoid, eine Reaktion, die auch von *Willstätter* (2) benutzt worden ist, eine stärkere Wirkung des Trypsins erfolgen könnte, wenn die anderen Fermente sonst die Trypsinwirkung hinderten. Es mag gleich vorausgeschickt werden, daß eine Beeinflussung in diesem Sinne, also eine Förderung der Trypsinwirkung, in keinem Falle beobachtet wurde.

Wenn man die Wirkung von andersartigen Substanzen, in meinem Falle von Cholesterin und Lecithin, auf die Fermentwirkung prüft, so ist naturgemäß nicht klar, ob diese Wirkung auf das Ferment, das Substrat oder den Komplex Ferment-Substrat wirkt. Auch meine Untersuchungen bringen hierüber keinen Aufschluß, sie sollen nur zeigen, wie die Zugabe eines fein gelösten bzw. kolloidalen „Lipoids" sich im Ablauf der Fermentreaktion offenbart.

Die Versuchsanordnung war prinzipiell die, daß eine gewisse Menge einer durch Lösen in kaltem Wasser hergestellten und filtrierten Pankreatinlösung mit einem Puffer und einer gewissen Menge Caseinlösung versetzt wurde; hierzu kamen verschiedene Mengen Lecithin- bzw. Chol-

esterinsuspensionen. Diese letzteren stellte ich her, wie in meiner vorangehenden Arbeit beschrieben: das Cholesterin durch Lösen in Aceton und Eingießen der Lösung in destilliertes Wasser; die des Lecithins durch Lösen in Äther und Eingießen der ätherischen Lösung in Wasser. Der Äther bzw. Aceton wurde auf dem Wasserbade quantitativ entfernt. Über gewisse Schwierigkeiten bei der Cholesterindarstellung und die nicht gleichmäßige Eignung der Cholesterinpräparate zur Herstellung feinster Emulsionen habe ich schon in meiner vorigen Arbeit berichtet. Als Pufferlösung benutzte ich Mischungen von n/10 Borat bzw. Citrat mit n/10 HCl. Zur Herstellung der Caseinlösungen benutzte ich reinstes Casein *Hammarsten*, das ich folgendermaßen herstellte. Ich löste eine gewisse Menge Casein in n NaOH, gab ungefähr 100 ccm Wasser hinzu, erhitzte zum Sieden und neutralisierte nach Abkühlung die überschüssige Natronlauge durch n HCl. Endlich wurde auf 200 ccm aufgefüllt. Ich brauchte für die verschiedenen Lösungen folgende Mengen.

Caseinlösung Proz.	Casein g	Zugegebene NaOH ccm	Zugegebene HCl ccm
0,1	0,2	11	10
0,2	0,4	12	10
0,5	1,0	15	10
1,0	2,0	20	10
2,0	4,0	25	10

Die auf diese Weise dargestellten Lösungen zeigten eine p_H zwischen 7 und 7,2. Diese Differenz ist nicht von großer Bedeutung, da durch die zugegebene Pufferlösung die dieser eigentümliche p_H hergestellt wird.

Für meine Versuche brachte ich die erforderlichen Mengen Pankreatinlösung, Pufferlösung, Caseinlösung sowie den Cholesterin- bzw. Lecithinzusatz in ein Meßkölbchen von 50 ccm. Es wurde in diesem 30 Minuten bei 40 bzw. 45° verdaut, herausgenommen, schnell abgekühlt und sofort entweder nach der im hiesigen Institut üblichen Methode mit kolloidalem Eisen oder mit Trichloressigsäure enteiweißt. Für das letzte Verfahren wurden 10 ccm einer 20proz. Trichloressigsäurelösung angewandt. Nach den Enteiweißungen wurde auf 50 ccm aufgefüllt, filtriert und je 10 ccm zur Analyse verwandt. Die Versuche sind sämtlich kontrolliert und mit allen Vorsichtsmaßregeln ausgeführt. Versuche einer Reihe wurden zusammengesetzt und zusammen verarbeitet.

Die Versuche 1 bis 8 zeigen die Verhältnisse bei Anwendung von Cholesterinsuspension. Sie sind so ausgeführt, daß zunächst in den Versuchen 1 bis 3 bei gleicher Menge der Caseinlösung, der Fermentlösung und des Puffers die Cholesterinkonzentration variiert wurde.

In den Versuchen 4 bis 6 wurde bei Gleichbleiben der anderen Lösungen die Menge der Pufferlösung variiert; endlich zeigt der Versuch 7 den Einfluß einer Änderung der Pankreatinmenge. Aus allen diesen Versuchen ergibt sich, daß die Zugabe von Cholesterin in keinem Falle bei sämtlichen untersuchten p_H zwischen 5,3 und 10,6 irgend einen Einfluß auf die Menge des durch das Ferment freigesetzten Stickstoffs ausübte. Dasselbe gilt vom Versuch 8, in welchem zunächst Pankreatinlösung, Puffer und Cholesterin zusammengebracht wurden und erst nach einiger Zeit das Casein zugefügt wurde. Cholesterin ist demnach in allen Fällen auf die Wirkung des untersuchten Fermentpräparates wirkungslos.

Die anderen Versuche beschäftigen sich mit der Wirkung des Lecithins. Hier ergibt sich prinzipiell aus meinen Ergebnissen, daß die Lecithinwirkung einerseits abhängig ist von der Menge des zugesetzten Lecithins, andererseits von der Reaktion. Beim Vergleich der Versuche 9 bis 11, in welchen alle anderen Komponenten gleich blieben, während die Menge des Lecithins variiert wurde — angewandt im Versuch 9 eine 0,3proz., im Versuch 10 eine 0,06proz., im Versuch 11 eine 0,03proz. Lösung —, zeigt sich deutlich der erheblich stärkere Einfluß größerer Lecithinmengen. Er ist im Versuch 11 kaum angedeutet, im Versuch 10 etwas deutlicher, im Versuch 9 ganz eklatant. In allen Fällen ist eine Beeinflussung nur bei alkalischer Reaktion festzustellen, und zwar nimmt, wie Versuch 9 zeigt, bei stärkerer Alkalinität die Wirkung wieder etwas ab. Sie fehlt vollständig noch bei $p_H = 6{,}8$, erreicht dann mit einem Sprunge das Maximum bei 7,6 und nimmt dann langsam bis p_H 10,65 wieder ab, bleibt aber noch hier sehr deutlich.

Wir sehen das prinzipiell gleiche Bild im Versuch 12, während in Versuch 13 zwar auch eine Schädigung nur bei alkalischer Reaktion statthat, diese aber bei weitem weniger ausgesprochen ist. Es scheint, daß die Schädigungen am größten bei der Reaktion sind, bei welcher ohne Zusatz die Verdauung optimal ist; von dort ab geht nach der sauren Seite hin ein scharfer Absturz, nach der alkalischen eine sehr langsame progressive Abnahme. Dieses Verhalten ist nicht überall in gleicher Weise ausgeprägt.

Die Versuche 14 bis 16, in denen bei Gleichbleiben der anderen Komponenten die Menge des Caseins geändert wurde, zeigen die gleichen Verhältnisse; auch hier bei saurer Reaktion kein Einfluß, bei alkalischer Hemmung durch das zugesetzte Lecithin, die auch am stärksten bei der Reaktion p_H 7,6 auftritt, aber auch bei alkalischerer deutlich ist. Bemerken möchte ich noch, daß durch Zugabe der Lecithinlösung eine Beeinflussung der Reaktion nicht stattfand; die Lecithinlösung war ebenfalls neutral.

Literatur.

1) Diese Zeitschr. 142, 222. — 2) Zeitschr. f. physiol. Chem. 125, 132.

Versuch 1.

3,0 ccm 0,1 proz. Pankreatinlösung, 4,0 ccm Pufferlösung, 5,0 ccm 0,01 proz. Cholesterinsuspension, 15,0 ccm 0,5 proz. Caseinlösung. Enteiweißung mit Trichloressigsäure.

p_H	Gesamt-N in 50,0 ccm	
	mit Cholesterin mg	ohne Cholesterin mg
5,3	2,94	2,94
6,0	3,86	3,9
7,6	5,25	5,25
9,1	5,6	5,6
9,8	5,06	5,04

Versuch 2.

3,0 ccm 0,1 proz. Pankreatinlösung, 4,0 ccm Pufferlösung, 5,0 ccm 0,05 proz. Cholesterinsuspension, 15,0 ccm 0,5 proz. Caseinlösung. Enteiweißung mit Eisen.

p_H	Gesamt-N	
	mit Cholesterin mg	ohne Cholesterin mg
5,3	3,47	3,44
7,6	6,60	6,60
9,8	6,38	6,38

Versuch 3.

3,0 ccm 0,1 proz. Pankreatinlösung, 4,0 ccm Pufferlösung, 5,0 ccm 0,1 proz. Cholesterinsuspension, 10,0 ccm 0,5 proz. Caseinlösung. Verdauung bei 40° C. Enteiweißung mit Trichloressigsäure.

p_H	Gesamt-N	
	mit Cholesterin mg	ohne Cholesterin mg
5,3	2,73	2,66
6,0	4,28	4,22
7,6	5,32	5,32
9,1	6,07	6,04
9,8	5,68	5,68

Versuch 4.

3,0 ccm 0,1 proz. Pankreatinlösung, 3,0 ccm Pufferlösung, 12,0 ccm Wasser, 5,0 ccm 0,1 proz. Cholesterinsuspension, 15,0 ccm 0,5 proz. Caseinlösung. Verdauung bei 45° C. Enteiweißung mit Trichloressigsäure.

p_H	Gesamt-N mit Cholesterin mg	Gesamt-N ohne Cholesterin mg
5,3	2,94	2,94
6,0	4,25	4,20
7,6	5,32	5,32
9,1	5,93	5,88
9,8	5,60	5,60

Versuch 5.

3,0 ccm 0,1 proz. Pankreatinlösung, 15,0 ccm Pufferlösung, 5,0 ccm 0,1 proz. Cholesterinsuspension, 15,0 ccm 0,5 proz. Caseinlösung. Verdauung bei 45° C. Enteiweißung mit Eisen.

p_H	Gesamt-N mit Cholesterin mg	Gesamt-N ohne Cholesterin mg
5,3	2,62	2,62
6,0	3,92	3,92
7,6	5,09	5,04
9,1	5,32	5,26
9,8	4,62	4,64

Versuch 6.

1,0 ccm 0,1 proz. Pankreatinlösung, 4,0 ccm Pufferlösung, 4,0 ccm 0,1 proz. Cholesterinsuspension, 10,0 ccm 0,5 proz. Caseinlösung. Verdauung bei 40° C. Enteiweißung mit Trichloressigsäure.

p_H	Gesamt-N mit Cholesterin mg	Gesamt-N ohne Cholesterin mg
5,3	0,71	0,70
6,0	1,06	1,06
6,8	1,26	1,24
7,6	1,26	1,23
8,4	1,45	1,47
9,1	1,61	1,61
9,8	1,54	1,54
10,65	1,37	1,372

Versuch 7.

2,0 ccm 0,2proz. Pankreatinlösung, 4,0 ccm Pufferlösung, 5,0 ccm 0,1 proz. Cholesterinsuspension, 10,0 ccm 0,2proz. Caseinlösung. Verdaut bei 40° C. Enteiweißung mit Eisen.

p_H	Gesamt-N	
	mit Cholesterin mg	ohne Cholesterin mg
5,3	1,12	1,12
6,0	1,33	1,33
6,8	1,35	1,35
7,0	1,99	1,99

Versuch 8.

3,0 ccm 0,1 proz. Pankreatinlösung, 4,0 ccm Pufferlösung, 5,0 ccm 0,1 proz. Cholesterinsuspension. Im Meßkolben zusammengebracht und 1 Stunde bei Zimmertemperatur stehengelassen, dann in jeden Meßkolben 15,0 ccm 0,5proz. Caseinlösung gegeben, bei 45° C verdaut. Mit Trichloressigsäure enteiweißt.

p_H	Gesamt-N	
	mit Cholesterin mg	ohne Cholesterin mg
5,3	3,97	3,97
6,0	5,76	5,74
7,6	8,31	8,31
9,1	—	—
9,8	7,57	7,57

Versuch 9.

3,0 ccm 0,2proz. Pankreatinlösung, 4,0 ccm Pufferlösung, 5,0 ccm 0,3proz. Lecithinlösung, 15,0 ccm 0,5proz. Caseinlösung. Verdaut bei 40° C 30 Min. Enteiweißung mit Trichloressigsäure.

p_H	Gesamt-N	
	mit Lecithin mg	ohne Lecithin mg
5,3	2,64	2,66
6,0	3,58	3,61
6,8	3,97	3,92
7,6	3,86	5,04
8,4	4,78	5,74
9,1	4,73	5,60
10,65	4,06	4,62

Versuch 10. 3,0 ccm 0,2proz. Pankreatinlösung, 4,0 ccm Pufferlösung, 5,0 ccm 0,06proz. Lecithinlösung, 15,0 ccm 0,5proz. Caseinlösung. Verdaut bei 40° C 30 Min. Enteiweißung mit Trichloressigsäure.

p_H	Gesamt-N mit Lecithin mg	Gesamt-N ohne Lecithin mg
5,3	2,8	2,8
6,8	4,06	4,06
7,6	4,62	4,90
9,1	4,76	5,01
10,65	4,06	4,20

Versuch 11. 3,0 ccm 0,2proz. Pankreatinlösung, 4,0 ccm Pufferlösung, 5,0 ccm 0,03proz. Lecithinlösung, 15,0 ccm 0,5proz. Caseinlösung. Verdaut bei 40° C 30 Min. Enteiweißung mit Trichloressigsäure.

p_H	Gesamt-N mit Lecithin mg	Gesamt-N ohne Lecithin mg
5,3	2,77	2,80
6,8	3,78	3,78
7,6	4,17	4,20
10,65	3,78	3,85

Versuch 12. 3,0 ccm 0,2proz. Pankreatinlösung, 15,0 ccm Pufferlösung, 5,0 ccm 0,3proz. Lecithinlösung, 15,0 ccm 0,5proz. Caseinlösung. Verdaut bei 40° C 30 Min. Enteiweißung mit Eisen.

p_H	Gesamt-N mit Lecithin mg	Gesamt-N ohne Lecithin mg
5,3	2,24	2,24
6,8	4,98	5,08
7,6	5,26	6,02
10,65	4,11	4,76

Versuch 13. 1,0 ccm 0,08proz. Pankreatinlösung, 4,0 ccm Pufferlösung, 3,0 ccm 0,1proz. Lecithinlösung, 10,0 ccm 0,5proz. Caseinlösung. Verdaut bei 40° C 30 Min. Enteiweißung mit Trichloressigsäure.

p_H	Gesamt-N mit Lecithin mg	Gesamt-N ohne Lecithin mg
4,65	1,092	1,092
5,3	2,128	2,156
6,0	3,304	3,276
6,8	4,48	4,48
7,6	5,46	5,60
8,4	6,446	6,692
9,1	5,936	6,328
9,8	5,46	5,79
10,4	5,26	5,54

Versuch 14.

3,0 ccm 0,2proz. Pankreatinlösung, 4,0 ccm Pufferlösung, 5,0 ccm 0,1proz. Lecithinlösung, 15,0 ccm 0,2proz. Caseinlösung. Verdaut bei 40° C 30 Min. Enteiweißung mit Trichloressigsäure.

p_H	Gesamt-N	
	mit Lecithin mg	ohne Lecithin mg
5,3	2,24	2,24
6,8	3,64	3,64
7,6	3,78	3,92
10,65	3,22	3,36

Versuch 15.

3,0 ccm 0,2proz. Pankreatinlösung, 4,0 ccm Pufferlösung, 5,0 ccm 0,1proz. Lecithinlösung, 15,0 ccm 1,0proz. Caseinlösung. Verdaut bei 40° C 30 Min. Enteiweißung mit Trichloressigsäure.

p_H	Gesamt-N	
	mit Lecithin mg	ohne Lecithin mg
5,3	3,92	3,99
6,8	6,58	6,58
7,6	6,72	7,14
10,65	7,28	7,48

Versuch 16.

3.0 ccm 0,2proz. Pankreatinlösung, 4,0 ccm Pufferlösung, 5,0 ccm 0,1proz. Lecithinlösung, 15,0 ccm 2,0proz. Caseinlösung. Verdaut bei 40° C 30 Min. Enteiweißung mit Trichloressigsäure.

p_H	Gesamt-N	
	mit Lecithin mg	ohne Lecithin mg
5,3	2,99	2,99
6,8	7,98	7,98
7,6	10,50	10,92
10,65	7,98	8,26

Über die Wirkung der Alkaloide aus der Atropin-, Cocain- und Morphingruppe auf die Hefe-Invertase.

Von

P. Rona, C. van Eweyk und M. Tennenbaum.

(Aus der chemischen und experimentell-biologischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 29. November 1923.)

Mit 25 Abbildungen im Text.

1. Einleitung.

In den nachstehend angeführten Versuchen ist es unternommen worden, den Einfluß zu studieren, den eine Anzahl pharmakologisch wichtiger und chemisch gut bekannter Alkaloide auf die Wirkung der Hefeinvertase ausüben. Bei der Wahl der von uns verwendeten Gifte kam es einmal darauf an, chemisch und pharmakologisch möglichst verschiedenartige Substanzen in den Kreis der Betrachtung zu ziehen. Andererseits lag uns daran festzustellen, wie bei ein und demselben Gifte mehr oder weniger tiefgreifende Veränderungen des Moleküls in der Wirkung auf das Ferment erkennbar werden. Deshalb wurde der Einfluß eingreifender Veränderungen des Alkaloidmoleküls untersucht, seiner Substitutionsprodukte sowie auch seiner Spaltprodukte. Bei sämtlichen von uns untersuchten Alkaloidgruppen wurde zunächst einmal die Wirkungsweise des Hauptvertreters festgestellt. Dazu gehört 1. die Abhängigkeit des Wirkungsgrades von der Alkaloidkonzentration, 2. die Abhängigkeit des Wirkungsgrades von der Reaktion des Reaktionsgemisches, sowie 3. die Ermittlung, ob die Alkaloidwirkung reversibel ist oder nicht. War über diese drei Punkte Klarheit gewonnen, so wurde das Alkaloid, wenn möglich, je nachdem, ob es gewöhnlich als Razemkörper oder als optisch aktiv vorkommt, in seiner Wirkung mit einem seiner optischen Isomeren

bzw. mit seinen optischen Antipoden verglichen. Ferner wurden teils Spaltprodukte, teils durch Substitution entstandene Verwandte nach den gleichen drei Gesichtspunkten untersucht.

2. Übersicht der untersuchten Alkaloide.

Die untersuchten Alkaloide[1]) waren folgende:

A. Atropingruppe.

1. d, l-Atropin. Kristallisierte Atropinbase vom Schmelzpunkt 115° (unkorrigiert). Das Präparat wurde in genau abgewogener Menge in einem geringen Überschuß normaler Schwefelsäure unter leichtem Erwärmen gelöst, durch Zusatz von n/10 Natronlauge gegen Lackmus neutralisiert und auf ein bestimmtes Volumen mit Wasser aufgefüllt.

2. l-Hyoscyamin. Der Schmelzpunkt der kristallinischen Base betrug 105 bis 106° (unkorrigiert), ihre spezifische Drehung in neutraler wässeriger Lösung in Übereinstimmung mit den Angaben der Literatur bei 20° — 25,04°. Die Zubereitung der l-Hyoscyaminbase erfolgte in der gleichen Weise wie beim Atropin.

3. Tropin. Die Darstellung dieser Substanz geschah aus tropinreichen Fabrikationsrückständen in der Weise, daß das dunkle, sirupöse Ausgangsmaterial unter Zusatz überschüssiger Pottasche mit Alkohol und Äther extrahiert, die Extrakte mit Kohle gereinigt, mit Chlorcalcium getrocknet und schließlich abgedunstet wurden. Es resultierten Strahlenbüschel, deren Schmelzpunkt unscharf unterhalb 60° lag, deren Verwendung wegen ihrer hygroskopischen Eigenschaften auf Schwierigkeiten stieß, so daß die Substanz durch Behandeln mit ätherisch-alkoholischer Schwefelsäure in das Sulfat übergeführt wurde, welches als schneeweißes trockenes Pulver erhalten wurde. Die Zubereitung zu den Versuchen erfolgte sinngemäß in der gleichen Weise wie beim Atropin.

4. Tropasäure. Aus unreiner Tropasäure, die als Fabrikationsrückstand vorlag, konnte sie durch zwei- bis dreimaliges Umkristallisieren aus heißem Wasser unter Verwendung von Tierkohle als weißes Pulver mit dem Schmelzpunkt 117 bis 118° gewonnen werden. In den Versuchen wurde eine abgewogene Menge der Säure mittels n/10 Natronlauge neutralisiert und auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt.

Das Präparat war ein Razemkörper.

5. Atropinmethylbromat. Diese Substanz, bei welcher das Stickstoffatom des Tropinrestes fünfwertig ist:

$$C_{16}H_{20}O_2{=}\underset{\textstyle Br}{\underset{|}{N}}{=}(CH_3)_2$$

war ein weißes Kristallmehl vom Schmelzpunkt 219 bis 220° und erwies sich als optisch inaktiv. Zu den Versuchen wurde es in neutraler Lösung verwendet.

6. Scopolaminhydrobromid; Präparat der Pharmakopöe.

---

[1]) Wir sind den chemischen Fabriken E. Merck-Darmstadt sowie namentlich der Th. Teichgräber A.-G. für die Überlassung zahlreicher Ausgangsmaterialien aufrichtig dankbar.

B. Cocaingruppe.

1. l-Cocain stand als Hydrochlorid zur Verfügung. Das Präparat schmolz unter Zersetzung bei 180 bis 181° und zeigte eine spezifische Drehung von — 62,3° bei 20° C. Es wurde in neutraler Lösung verwendet.

2. d, ψ-Cocainbase wies eine spezifische Drehung von + 44,1° auf. Dieses Präparat ist nicht der optische Antipode des l-Cocains.

3. l-Ecgonin stand als „Base" (l-Ecgonin reagiert sauer) und als Hydrochlorid zur Verfügung. Schmelzpunkt der Base bei 196 bis 197° (unkorrigiert), das Chlorhydrat zersetzte sich oberhalb 230°.

4. d-Ecgonin wurde in folgender Weise aus l-Ecgonin gewonnen: 15 g l-Ecgonin wurden mit 5 g KOH unter Zusatz von 50 ccm H_2O auf dem Wasserbade am Steigrohr 24 Stunden lang erhitzt.

Das Gemenge wurde nun mit Salzsäure neutralisiert und eingedampft, der Rückstand mit absolutem Alkohol extrahiert, der alkoholische Extrakt mit der gleichen Menge Äther versetzt und filtriert. Beim Abdunsten des Filtrats resultierte d-Ecgonin vom Schmelzpunkt 254 bis 255° und einer spezifischen Drehung von + 17,2°.

Die beiden Ecgonine wurden wie die anderen Präparate in neutraler wässeriger Lösung von genau bekannter Konzentration zu den Versuchen verwendet.

C. Morphingruppe.

1. Morphinbase und -hydrochlorid, Präparat der Pharmakopöe. Die spezifische Drehung in neutraler wässeriger Lösung betrug — 95,8°.

2. Kodeinphosphat, Präparat der Pharmakopöe. Das Kodein entsteht aus dem Morphin durch Ersatz eines H durch OCH_3.

3. Dioninhydrochlorid, Präparat der Pharmakopöe. Es ist ein höheres Homologes des Kodeins, indem die OCH_3-Gruppe durch OC_2H_5 ersetzt ist.

D. Pilocarpinhydrochlorid

vom Schmelzpunkt 202° und mit der spezifischen Drehung + 82°.

E. Anhang.

Vereinzelte Versuche wurden angestellt mit:

Cotarninhydrochlorid. . . . . $C_{12}H_{13}NO_3HCl + 2 H_2O$
Berberin . . . . $C_{20}H_{17}NO_4$
Novocain . . . . $C_{11}H_{16}N_2O_2$

8. Durchführung der Versuche.

Die erforderlichen Reagenzien waren:

1. Invertinlösung.

Die Herstellung geschah nach der Vorschrift von *L. Michaelis* in der Weise, daß käufliche Bäckereihefe mit der doppelten Menge H_2O gut verrührt wurde und nach Zusatz von etwas $CHCl_3$ 4 bis 5 Tage lang verschlossen im Brutschrank autolysiert wurde. Nach Zusatz von einigen Tropfen konzentrierter Essigsäure wurde so viel Kaolin zugesetzt, wie dem fünften Teile der verwendeten Hefemenge entsprach, gut durchgeschüttelt und durch eine mit Kaolin gedichtete Nutsche filtriert. Die klare etwas gelbe Lösung erhielt sich, mit Toluol überschichtet und im Eisschrank aufbewahrt, monatelang wirksam. (Über das gereinigte Ferment vgl. S. 516).

2. Phosphatpuffer.

Die Puffer wurden durch Vermischen von m/3 primärem und m/3 sekundärem Natriumphosphat hergestellt.

3. Alkaloidlösung (neutral).
4. 12proz. Rohrzuckerlösung.

Nun wurden in zwei Meßzylindern zu 100 ccm je 5 ccm des Phosphatpuffers gebracht, dazu je 2 ccm Ferment. In den einen Zylinder, dessen Inhalt für den Hauptversuch bestimmt war, wurde eine vorher berechnete Menge Alkaloid gebracht, in den anderen, der als Kontrolle diente, das gleiche Volumen H_2O. Dann wurde der Inhalt beider Zylinder mit H_2O auf je 35 ccm aufgefüllt und die Zylinder in ein *Ostwald*sches Wasserbad mit Rührwerk, dessen Temperatur auf 32° (+ 0,1°) einreguliert war, gebracht. Nach einstündigem Verweilen darin hatten die Zylinder die Temperatur des H_2O-Bades angenommen, und nun wurde in jeden Zylinder je 25 ccm einer 32° warmen 12proz. Rohrzuckerlösung gebracht, rasch durchgemischt und der Zeitpunkt notiert. Unmittelbar danach wurden aus jedem Zylinder zu einem gleichfalls notierten Zeitpunkte — das Intervall zwischen dem Versuchsbeginn und der ersten Entnahme betrug zwischen 0,5 bis 1,5 Minuten und ist in den Protokollen jeweils angeführt — 10 ccm entnommen und in eine 2 ccm gesättigte Sodalösung enthaltende kleine Flasche gebracht. In der gleichen Weise wurden die späteren Entnahmen durchgeführt. Es mag noch erwähnt werden, daß sämtliche Abmessungen Pipettenabmessungen waren.

Die entnommenen und mit Soda versetzten Proben wurden 1 bis 2 Stunden lang sich selbst überlassen, dann in Polarimeterröhren von 10 cm Länge eingefüllt und die Drehung mittels eines Polarimeters mit dreiteiligem Gesichtsfeld bestimmt. Die Ablesung berücksichtigte $^1/_{100}$ Grade, und zwar war es möglich, nach einiger Übung die Ablesungsfehler innerhalb $\pm 0{,}01$ zu halten. Die gefundenen Drehungen wurden in einer Tabelle zusammengestellt, deren erste Rubrik die Zeit enthält, wobei der Zeitpunkt des Zusatzes der Zuckerlösung mit $t = 0$ bezeichnet wurde, die t-Werte für die übrigen Drehungen geben an, wieviel Minuten bis zur Entnahme verstrichen waren.

In der zweiten Spalte sind die zugehörigen Drehungen verzeichnet, wobei die neben $t = 0$ angeführte Drehung durch Extrapolation gewonnen wurde. Aus dieser Drehung für $t = 0$ wurde die maximale Drehungsänderung a des Gemisches in der Weise berechnet, daß die Nulldrehung mit 1,31 multipliziert wurde. Die dritte Spalte unserer Tabellen enthält die Differenzen zwischen der jeweiligen Drehung und der Nulldrehung, die wir in der üblichen Weise als x bezeichnet haben. Die vierte Spalte enthält die Werte für $a - x$, und in der fünften Spalte ist die Reaktionskonstante erster Ordnung k angeführt, welche aus den Werten von a, $a - x$ und t nach der Formel der monomolekularen Reaktion

$$k = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a - x}$$

berechnet wurde.

Es wurde immer $k \cdot 10^5$ angegeben.

In dieser Weise gelangten wir jedesmal bei der Kontrolle sowohl wie beim Hauptversuch zu einer Reihe von Konstanten $k \cdot 10^5$, deren arithmetische Mittel miteinander in folgender Weise verglichen wurden. Hatten wir z. B. bei unserem Hauptversuch eine Konstante von 800, in der Kontrolle dagegen eine Konstante von 1000, so folgerten wir daraus, da sich ja diese Probe und der Hauptversuch, für uns erkennbar, nur durch den Alkaloidgehalt des Hauptversuchs unterschieden, daß die zugesetzte Substanz den enzymatischen Vorgang hemmt. Diese Hemmung ließ sich in Prozenten aus-

drücken, indem die Differenz der beiden Konstanten mit 100 multipliziert und durch die Konstante der Kontrolle dividiert wurde. In unserem Beispiel würde also eine Hemmung von 20 Proz. vorgelegen haben.

Von den 60 ccm Gesamtvolumen jedes Versuchs wurden vier- bis fünfmal 10 ccm zur Feststellung der Drehung entnommen. Der Rest wurde zur elektrometrischen Bestimmung der H-Ionenkonzentration verwendet, die in jedem Protokoll als Wasserstoffexponent p_H angeführt wird. Versuche, bei welchen die p_H-Werte des Hauptversuchs und der Kontrolle irgendwie stärker differierten, wurden verworfen. Es braucht nicht besonders erwähnt zu werden, daß in derselben Weise, wie hier geschildert, eine größere Anzahl von Versuchen gleichzeitig durchgeführt werden konnten, z. B. wenn mehrere Konzentrationen desselben Alkaloids untersucht wurden. In diesem Falle führten wir nur eine Kontrolle für drei bis fünf Hauptversuche mit. Sobald dagegen gleichzeitig bei verschiedenen H-Ionenkonzentrationen untersucht wurde, führten wir selbstverständlich für jedes p_H eine besondere Kontrolle mit.

Wegen des großen Umfanges unserer Protokolle müssen wir darauf verzichten, sie vollständig mitzuteilen; wir beschränken uns darauf, die Giftkonzentrationen, das p_H, die Reaktionskonstante erster Ordnung $\times 10^5$ sowie die Hemmung in Tabellenform anzuführen; bei einer Anzahl typischer Versuche sind graphische Darstellungen zur Erläuterung beigefügt.

4. Versuche.

A. Versuche mit Atropin.

a) Abhängigkeit der Giftwirkung von der Konzentration des Atropins.

Die Variierung der Atropinmengen wurde derart vorgenommen, daß die Giftkonzentrationen eine geometrische Reihe bildeten (Versuche 1, 3, 5, 6, Tabelle I). Es ergibt sich, daß bei gleichem oder annähernd gleichem p_H die Hemmung der Invertasewirkung um so stärker ist, je größer die verwendete Atropinkonzentration ist. Die Art dieser Abhängigkeit ergibt sich aus den graphischen Darstellungen, in welchen in den Abb. 1, 2, 3, 4 die Zeit als Abszisse und die Werte $a - x$ als Ordinaten aufgetragen sind, bei den Abb. 1a, 2a, 3a, 4a dagegen der negative Logarithmus der Atropinkonzentration die Abszissen und die zugehörige Hemmung die Ordinaten bilden. Eine Betrachtung der Abbildungen lehrt, daß innerhalb der Fehlergrenzen und innerhalb der eingehaltenen Versuchsbedingungen die Hemmung, die wir als Maß der Giftwirkung ansehen, den Logarithmen der Giftmengen proportional ist.

b) Abhängigkeit der Giftwirkung des Atropins vom p_H.

Bei diesen Versuchen wurde der Einfluß stets der gleichen Atropinmenge ($1{,}1 \cdot 10^{-4}$ g-Mol.) bei variiertem p_H untersucht. Für jeden Versuch wurde selbstverständlich eine besondere Kontrolle von gleichem p_H mitgeführt, deren Konstante $k \cdot 10^5$ die Basis für die Berechnung der Hemmung beim Hauptversuch lieferte. Die Ergebnisse sind in der Tabelle II zusammengestellt, aus welcher hervorgeht, daß die

Tabelle I. Atropin.

Zusammenstellung der Ergebnisse. Abhängigkeit der Hemmung von der Atropinkonzentration.

Versuchsnummer	Bezeichnung	p_H	Mole	Mittlere Konstante $k \cdot 10^5$	Hemmung in Proz.	
1	Kontrolle	6,95	—	264	—	Abb. 1a.
	Atropin I	6,95	$5 \cdot 10^{-5}$	181	31,4	
	„ II	6,92	$1,1 \cdot 10^{-4}$	140	47,0	
	„ III	6,92	$2,3 \cdot 10^{-4}$	107	59,5	
	„ IV	6,90	$5 \cdot 10^{-4}$	67	74,4	
3	Kontrolle	7,30	—	239	—	Abb. 2a.
	Atropin I	6,93	$5 \cdot 10^{-5}$	138	42,3	
	„ II	6,92	$1,1 \cdot 10^{-4}$	119	50,2	
	„ III	6,83	$2,3 \cdot 10^{-4}$	95	60,1	
	„ IV	6,74	$5 \cdot 10^{-4}$	71	70,5	
5	Kontrolle	6,84	—	240	—	Abb. 3a.
	Atropin I	6,89	$5 \cdot 10^{-5}$	179	25,4	
	„ II	6,89	$1,1 \cdot 10^{-4}$	131	45,4	
	„ III	6,87	$2,3 \cdot 10^{-4}$	102	57,5	
	„ IV	6,84	$5 \cdot 10^{-4}$	69	71,2	
6	Kontrolle	6,93	—	240	—	Abb. 4a.
	Atropin I	6,96	$5 \cdot 10^{-5}$	155	36,1	
	„ II	6,93	$1,1 \cdot 10^{-4}$	126	47,5	
	„ III	6,88	$2,3 \cdot 10^{-4}$	92	60,7	
	„ IV	6,86	$5 \cdot 10^{-4}$	61	74,6	

Tabelle II. Abhängigkeit der Hemmung von p_H.

Versuchsnummer	Bezeichnung	p_H	Mole	Mittlere Konstante $k \cdot 10^5$	Hemmung in Proz.
7	Kontrolle	5,88	—	428	—
	Atropin	5,88	$1,1 \cdot 10^{-4}$	270	37,0
	Kontrolle	5,38	—	514	—
	Atropin	5,38	$1,1 \cdot 10^{-4}$	341	33,7
7b	Kontrolle	5,90	—	475	—
	Atropin	5,90	$1,1 \cdot 10^{-4}$	328	37,0
	Kontrolle	6,17	—	387	—
	Atropin	6,17	$1,1 \cdot 10^{-4}$	246	36,3
	Kontrolle	6,60	—	286	—
	Atropin	6,60	$1,1 \cdot 10^{-4}$	165	42,0
7a	Kontrolle	6,24	—	410	—
	Atropin	6,16	$1,1 \cdot 10^{-4}$	229	38,2
	Kontrolle	5,28	—	578	—
	Atropin	5,22	$1,1 \cdot 10^{-4}$	448	22,5
	Kontrolle	4,10	—	506	—
	Atropin	4,12	$1,1 \cdot 10^{-4}$	420	1,9
7c	Kontrolle	6,98	—	135	—
	Atropin	6,98	$1,1 \cdot 10^{-4}$	73,8	43,8
	Kontrolle	5,32	—	485	—
	Atropin	5,32	$1,1 \cdot 10^{-4}$	363	25,0
	Kontrolle	5,30	—	430	—
	Atropin	5,33	$1,1 \cdot 10^{-4}$	335	24,5

Hemmungen mit zunehmendem p_H anwachsen, ein Verhalten, das den Schluß zuläßt, daß die Hemmung durch die Atropinbase bedingt

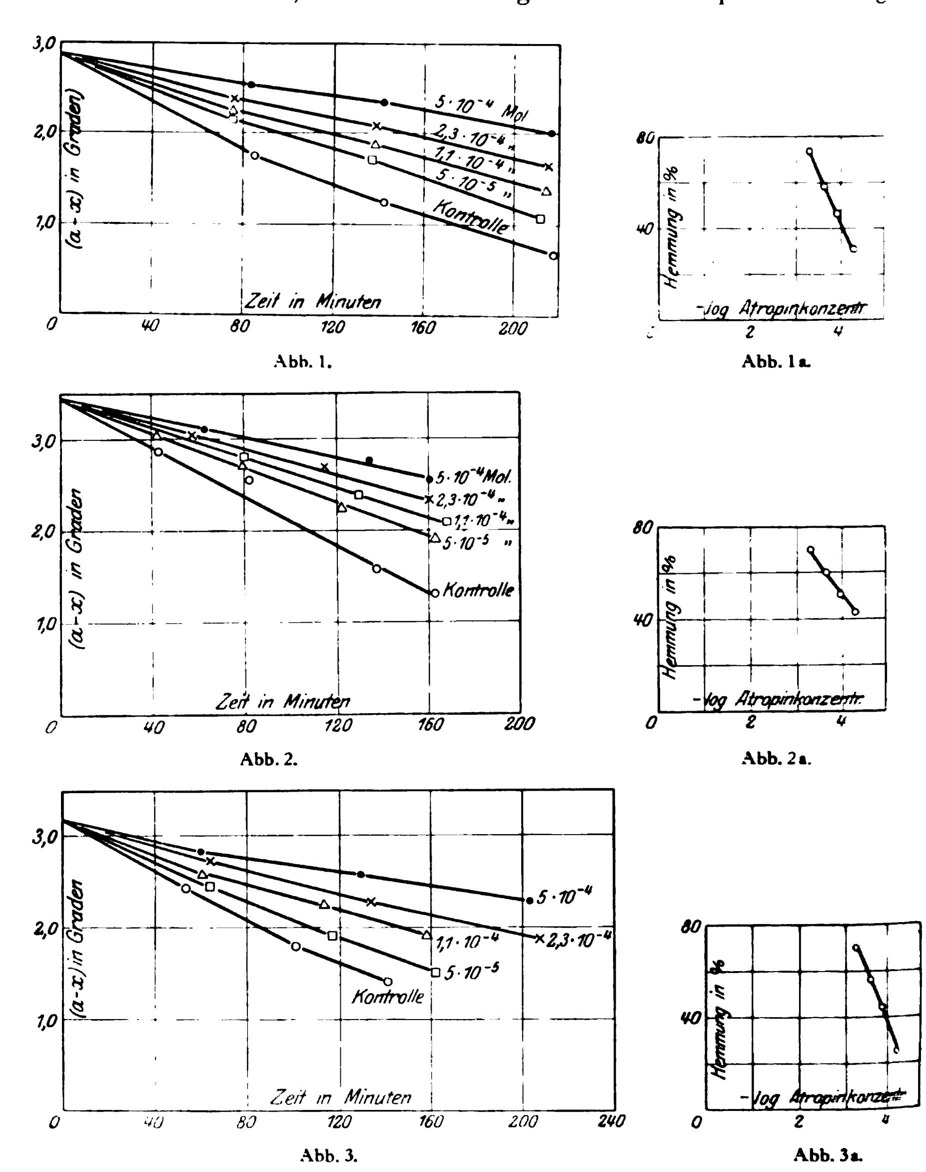


Abb. 1. Abb. 1a.

Abb. 2. Abb. 2a.

Abb. 3. Abb. 3a.

ist. Je mehr bei Zunahme der H-Ionen Atropinbase in Atropinsalz übergeht, um so geringer wird die Hemmung der Invertasewirkung (vgl. Abb. 5).

c) Die Reversibilität der Atropinwirkung.

Um zu prüfen, ob die Atropinwirkung reversibel ist, wurde zunächst so verfahren, daß man einen Versuch bei alkalischer Reaktion begann, die Konstante der Reaktionsgeschwindigkeit feststellte, dann durch Zufügen von primärem Natriumphosphat die Reaktion auf eine bekannte (ungünstige) saurere Reaktion brachte. Dann mußte, falls eine Reversibilität bestand, der sauren Reaktion entsprechend die Hemmung abnehmen. Dies ist tatsächlich der Fall, wie es aus der Tabelle III ersichtlich ist. Bei der Änderung des p_H von 7,40 auf 5,60 geht die Hemmung auf weniger als die Hälfte zurück.

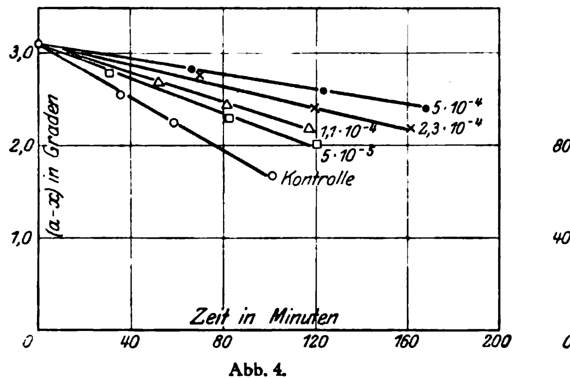


Abb. 4.

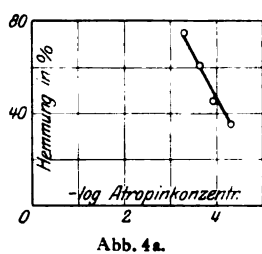


Abb. 4a.

Da es nur selten gelingt, im Hauptversuch und in der Kontrolle bei der Umschaltung der Reaktion auf ein annähernd gleiches p_H zu gelangen, wurde ferner zum Nachweis der Reversibilität die Dialyse einer in ihrer Wirkung durch Atropin stark gehemmten Invertaselösung herangezogen.

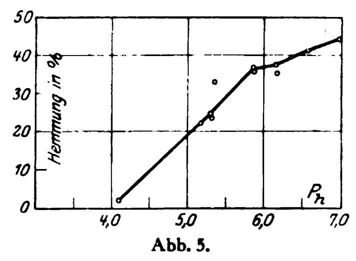


Abb. 5.

Je 10 ccm Invertaselösung wurden mit 5 ccm destillierten Wassers bzw. mit 5 ccm einer Atropinlösung versetzt. Die Atropinmenge betrug 0,1461 g. Nach der Mischung wurden jeder Portion 2 ccm entnommen und damit in der üblichen Weise eine Rohrzuckerinversion vorgenommen.

Tabelle III. Reversibilität.

Versuchsnummer	Bezeichnung	p_H	Mole	Mittlere Konstante $k \cdot 10^5$	Hemmung in Proz.
66e	Kontrolle	7,40	—	118	—
	Umschaltung	5,61	—	390	—
	Atropin	7,42	$2 \cdot 10^{-4}$	59,5	49,2
	Umschaltung	5,60	—	302	22,6

Der Versuch ohne Atropin wird mit C, der Versuch mit Atropin mit A bezeichnet. In der 2 ccm Atropin haltigen Fermentlösung befanden sich 0,01949 g Atropinbase.

$$C\ (p_H\ 6{,}61)\ k = 305, \qquad A\ (p_H\ 6{,}59)\ k = 192.$$

In der gleichen Weise wurden noch einmal je zwei Fermentportionen behandelt. Die Untersuchung ergab für

$$C_1\ (p_H\ 6{,}58)\ k = 313, \qquad A_1\ (p_H\ 6{,}59)\ k = 192.$$

Die Hemmung beträgt demnach 39,5 Proz.

Die Proben wurden 24 Stunden im Eisschrank sich selbst überlassen, dann wurden die vier Versuche in genau gleicher Weise wiederholt, wobei sich ergab:

$$C\ (p_H\ 6{,}51)\ k = 301; \qquad C_1\ (p_H\ 6{,}51)\ k = 310,$$
$$A\ (p_H\ 6{,}51)\ k = 161; \qquad A_1\ (p_H\ 6{,}52)\ k = 197.$$

Aus diesen Werten berechnet sich die prozentische Hemmung im Mittel zu 36,0 Proz.

Nun wurden die Proben je in eine *Schleicher-Schüll*sche Dialysierhülse gebracht und erst 2 Tage gegen destilliertes Wasser, dann noch 18 Stunden gegen fließendes Leitungswasser dialysiert, schließlich der Inhalt jeder Hülse auf 25 ccm aufgefüllt und je 10 ccm zum Versuch entnommen. Es ergab sich für

$$C\ (p_H\ 6{,}59)\ k = 172, \qquad C_1\ (p_H\ 6{,}59)\ k = 136,$$
$$A\ (p_H\ 6{,}59)\ k = 144, \qquad A_1\ (p_H\ 6{,}59)\ k = 139.$$

Die Atropinvergiftung ist somit reversibel.

d) Abhängigkeit der Hemmung von der Fermentmenge.

Schließlich wurde untersucht, wie bei gleichem p_H und bei gleicher Giftkonzentration eine Abstufung der Fermentmenge in der Hemmung zum Ausdruck kommt. In der Tabelle *IV* ist ein solcher Versuch aufgeführt. Es geht daraus hervor, daß bei einer Vermehrung des Ferments um 100 Proz. die Hemmung nur unwesentlich geändert wird, ein Ergebnis, das den Befunden von *Rona* und *Bloch* u. a. bei Versuchen mit Invertase und Chinin entspricht.

Tabelle IV.

Einfluß gleicher *Atropin*mengen auf *wechselnde* Fermentmengen.

Versuchsnummer	Bezeichnung	p_H	Mole	Fermentmenge ccm	Mittlere Konstante $k \cdot 10^5$	Hemmung in Proz.
1	Kontrolle . .	6,43	—	2	599	—
	Atropin . . .	6,45	$3{,}84 \cdot 10^{-4}$	2	245	59,2
2	Kontrolle . .	6,43	—	4	1458	—
	Atropin . . .	6,45	$3{,}84 \cdot 10^{-4}$	4	510	65

Ein anderer Versuch, der in genau der gleichen Weise durchgeführt wurde, bei dem im besonderen die gleiche Puffermischung in der gleichen Menge verwendet wurde, bei welchem aber aus äußeren Gründen das p_H nicht bestimmt werden konnte, ergab bei 2 ccm Ferment: Hemmung = 53,8 Proz., bei 4 ccm Ferment: Hemmung = 59,5 Proz.

Tabelle IVa.

Einfluß gleicher Atropinmengen auf wechselnde Fermentmengen.

Versuchsnummer	Bezeichnung	p_H	Mole	Fermentmenge ccm	Mittlere Konstante $k \cdot 10^5$	Hemmung in Proz.
1	Kontrolle . .	6,49	—	2	674	—
	Atropin . . .	6,49	$3{,}069 \cdot 10^{-4}$	2	269	60
2	Kontrolle . .	6,47	—	4	1285	—
	Atropin . . .	6,45	$3{,}069 \cdot 10^{-4}$	4	548	57,2

In weiteren Versuchen wurde die Fermentmenge in stärkerem Maße variiert. Als ein Beispiel, daß auch bei exzessiven Unterschieden — die Fermentmengen verhielten sich wie 1 : 15 — die durch die gleiche Atropinmenge bewirkte Hemmung innerhalb der Fehlergrenzen angenähert gleich bleibt, möge der folgende Versuch angeführt werden.

Tabelle IVb.

Versuchsnummer	Bezeichnung	p_H	Mole	Fermentmenge ccm	Mittlere Konstante $k \cdot 10^5$	Hemmung in Proz.
1	Kontrolle . .	5,85	—	2	1590	—
	Atropin . . .	5,83	$3{,}08 \cdot 10^{-4}$	2	893	44
2	Kontrolle . .	5,81	—	2 (1 : 15)	112	—
	Atropin . . .	5,79	$3{,}08 \cdot 10^{-4}$	2 (1 : 15)	51	54,5

e) Eine Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse zeigt folgendes:

1. Bei gleichem p_H und bei gleicher Fermentkonzentration ist die Hemmung der Invertasewirkung dem Logarithmus der Atropinkonzentration angenähert proportional.

2. Bei gleicher Ferment- sowie bei gleicher Atropinkonzentration wächst die Hemmung mit zunehmendem p_H.

3. Die Atropinhemmung ist reversibel.

4. Bei gleichem p_H und bei gleicher Atropinkonzentration ist die Hemmung von der Fermentmenge unabhängig.

B. Versuche mit l-Hyoscyamin.

Diese Versuche wurden unter den gleichen Gesichtspunkten wie die Atropinversuche durchgeführt. Zuerst wurde das Verhalten verschiedener, in geometrischer Progression abgestufter Hyoscyaminmengen untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle V enthalten und in den Abb. 6 und 6a in genau der gleichen Weise wie beim Atropin dargestellt. Auch hier bemerkt man die angenäherte Proportionalität zwischen der Hemmung und dem Logarithmus der verwendeten Hyoscyaminmenge.

Bei der Prüfung der Abhängigkeit der Hyoscyaminwirkung vom p_H, deren Resultate die Tabelle VI und die Abb. 7 enthalten, hat sich, wie bei den entsprechenden Atropinversuchen, herausgestellt, daß mit

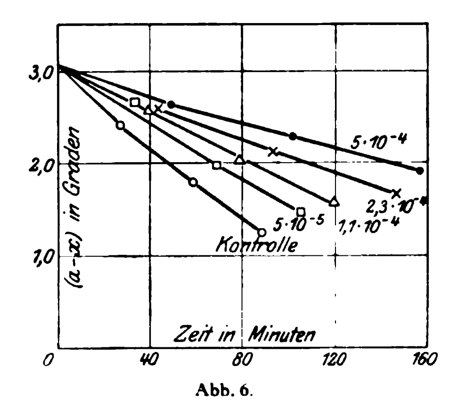


Abb. 6.

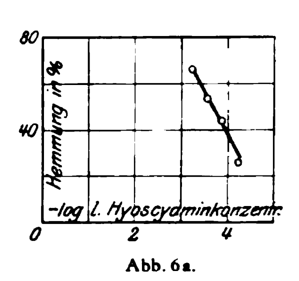


Abb. 6a.

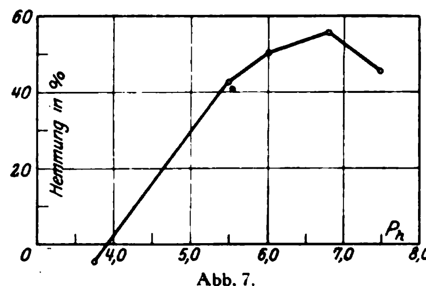


Abb. 7.

Zunahme des p_H die Gifthemmung ansteigt.

Schließlich wurde die l-Hyoscyaminwirkung auf die Invertase mit der des Atropins verglichen. Die gefundenen Werte, die sich auf sehr stark voneinander abweichende Wasserstoffzahlen beziehen, ergeben übereinstimmend, daß ein Unterschied zwischen den Wirkungen der beiden Modifikationen nicht existiert.

Tabelle V.

Wirkung von l-Hyoscyamin auf Invertin. Abhängigkeit von der Konzentration des l-Hyoscyamins.

Versuchs-nummer	Bezeichnung	p_H	Mole	Mittlere Konstante $k \cdot 10^5$	Hemmung in Proz.
8	Kontrolle	6,27	—	389	—
	l-Hyoscyamin I . . .	6,28	$5 \cdot 10^{-5}$	284	27,0
	„ II . . .	6,31	$1{,}1 \cdot 10^{-4}$	214	45,0
	„ III . .	6,32	$2{,}3 \cdot 10^{-4}$	177	54,5
	„ IV . . .	6,32	$5 \cdot 10^{-4}$	129	66,8

Bei den Versuchen Nr. 15, 16, 50 und 54 in Tabelle VI, 2, wurde l-Hyoscyaminsulfat benutzt; die Versuche Nr. 57, 60, 61, 62, und 63

dagegen wurden mit einer frisch von *Merck* bezogenen l-Hyoscyaminbase durchgeführt.

In den Versuchen Nr. 15, 16, 50 und 54 der Tabelle VI, 2, lag sowohl das Atropin als das l-Hyoscyaminpräparat als Sulfat vor, im Versuch 57 ist Atropinbase, l-Hyoscyaminsulfat und l-Hyoscyaminbase (aus dem Sulfat gewonnen) verglichen worden, die Nr. 60, 61, 62 und 63 enthalten Versuche mit einem frisch bezogenen Präparat l-Hyoscyaminbase (von *Merck*), verglichen mit Atropinsulfat. Man bemerkt in allen Versuchen eine gute Übereinstimmung der Hemmungswerte von entsprechenden Mengen Atropin und l-Hyoscyamin.

Bei unseren Versuchen wurde das Ferment der Reihe nach mit der Pufferlösung, mit der Giftlösung, mit Wasser und schließlich mit der Zuckerlösung vermischt. Da es von vornherein nicht zu überblicken war, ob durch eine bestimmte Reihenfolge der Zusätze das Ferment in besonderem Maße beeinflußt wird, wurden einige Versuche hierüber angestellt.

Zur Verwendung gelangte gereinigte Invertase und eine Atropinlösung, die in 25 ccm 0,3791 g trockene Base enthielt.

Es wurden angesetzt:

I. Kontrolle	II. Atropinversuch A	III. Atropinversuch B
5 ccm Puffer	5 ccm Puffer	5 ccm Puffer
28 „ H_2O	2,09 „ Atropinlösung	2,09 „ Atropinlösung
2 „ Ferment	2 „ Ferment	2 „ H_2O

Die Menge von 2,09 ccm der Giftlösung entspricht 10^{-4} Mol Atropin. Nach dem Durchmischen der einzelnen Volumina verblieben die Proben für ½ Stunde im Wasserbade. Nun wurden zugesetzt:

Zur Kontrolle	Zu II.	Zu III.
25 ccm Zuckerlösung	25,91 ccm H_2O	2 ccm Ferment
	25,0 „ Zuckerlösung	25 „ Zuckerlösung

Bei II. war also das Ferment mit einer relativ hoch konzentrierten Giftlösung einige Zeit in Berührung, während bei III. die gleiche Fermentmenge mit der gleichen Giftmenge in viel größerer Verdünnung zusammengebracht wurde. Dieses verschiedenartige Vorgehen macht für die Atropinhemmung des Ferments keinen Unterschied, wie aus den abgelesenen Drehungen hervorgeht.

I. Kontrolle $p_H = 6{,}50$		II. Atropinversuch A		III. Atropinversuch B	
t	Drehung	*t*	Drehung	*t*	Drehung
0,5′	2,00°	0,5′	2,00°	0,5′	2,00°
10	1,67	10	1,85	10	1,84
20	1,31	20	1,66	20	1,66
30	1,00	30	1,49	30	1,47

Bei einem weiteren derartigen Versuch wurden miteinander vermischt:

I. Kontrolle	II. Atropinversuch A	III. Atropinversuch B
5 ccm Puffer	5 ccm Puffer	5 ccm Puffer
2 „ Ferment	2 „ Ferment	2 „ Ferment
28 „ H_2O	25,91 „ H_2O	

Eine halbe Stunde später wurden zugesetzt:

Zu I.	Zu II.	Zu III.
25 ccm Zuckerlösung	2,09 ccm Atropinlösung	2,09 ccm Atropinlösung
	25 „ Zuckerlösung	25,91 „ H_2O
		25 „ Zuckerlösung

Die abgelesenen Drehungen waren:

I.		II.		III.	
t	Drehung	*t*	Drehung	*t*	Drehung
0,5′	1,98°	0,5′	1,99°	0,5′	1,99°
10	1,68	10	1,87	10	1,86
20	1,35	20	1,66	20	1,68
30	1,06	30	1,46	30	1.47

So daß auch in diesem Versuch die Reihenfolge der Zusätze ohne Einfluß ist.

C. Versuche mit Tropin.

In einem Vorversuch (Tabelle VII) wurde zunächst festgestellt, daß das Tropin überhaupt eine Hemmungswirkung auf die Invertase entfaltet. Diese Wirkung ist, wie aus dem Versuch auf Tabelle VIII ersichtlich,

Tabelle VI. Zusammenstellung der Resultate bei l-Hyoscyamin.

Versuchsnummer	Bezeichnung	p_H	Mole	Mittlere Konstante $k \cdot 10^5$	Hemmung in Proz.
	1. Abhängigkeit der Hemmung von p_H.				
15	Kontrolle	6,42	—	425	—
	l-Hyoscyamin	6,44	$1,1 \cdot 10^{-4}$	223	47,5
16	Kontrolle	6,42	—	444	—
	l-Hyoscyamin	6,43	$1,1 \cdot 10^{-4}$	228	48.6
50	Kontrolle	5,64	—	1122	—
	l-Hyoscyamin	5,64	$1,1 \cdot 10^{-4}$	728	35,1
54	Kontrolle	5,60	—	1056	—
	l-Hyoscyamin	5,56	$1,1 \cdot 10^{-4}$	657	37,8
57	Kontrolle	5,60	—	934	—
	l-Hyoscyamin	5,58	$1,1 \cdot 10^{-4}$	549	41,2
60	Kontrolle	6,03	—	903	—
	l-Hyoscyamin	6,03	$1,1 \cdot 10^{-4}$	445	50,7
61	Kontrolle	6,85	—	482	—
	l-Hyoscyamin	6,85	$1,1 \cdot 10^{-4}$	213	55,8
62	Kontrolle	5,55	—	1063	—
	l-Hyoscyamin	5,55	$1,1 \cdot 10^{-4}$	600	43,6
	Kontrolle	7,56	—	109	—
	l-Hyoscyamin	7,57	$1,1 \cdot 10^{-4}$	59	45,9
63	Kontrolle	3,77	—	1025	keine Hemmung
	l-Hyoscyamin	3,77	$1,1 \cdot 10^{-4}$	1083	

(Versuche 57–63: Abb. 7.)

Tabelle VI. (Fortsetzung.)

Versuchsnummer	Bezeichnung	p_H	Mole	Mittlere Konstante $k \cdot 10^5$	Hemmung in Proz.
	2. Vergleich mit Atropin.				
15	Kontrolle	6,42	—	425	—
	l-Hyoscyamin	6,44	$1,1 \cdot 10^{-4}$	223	47,5
	Atropin	6,42	$1,1 \cdot 10^{-4}$	212	50,1
16	Kontrolle	6,42	—	444	—
	l-Hyoscyamin	6,43	$1,1 \cdot 10^{-4}$	228	48,6
	Atropin	6,43	$1,1 \cdot 10^{-4}$	229	48,6
50	Kontrolle	5,64	—	1122	—
	l-Hyoscyamin	5,64	$1,1 \cdot 10^{-4}$	728	35,1
	Atropin	5,66	$1,1 \cdot 10^{-4}$	696	38,1
54	Kontrolle	5,60	—	1056	—
	l-Hyoscyamin	5,56	$1,1 \cdot 10^{-4}$	657	37,8
	Atropin	5,57	$1,1 \cdot 10^{-4}$	687,5	34,8
57	Kontrolle	5,60	—	934	—
	Atropin	5,58	$1,1 \cdot 10^{-4}$	573	37,6
	l-Hyoscyamin	5,58	$1,1 \cdot 10^{-4}$	549	41,2
	„	5,49	$1,1 \cdot 10^{-4}$	587	37,2
60	Kontrolle	6,03	—	903	—
	l-Hyoscyamin	6,03	$1,1 \cdot 10^{-4}$	445	50,7
	Atropin	6,05	$1,1 \cdot 10^{-4}$	438	51,5
61	Kontrolle	6,85	—	482	—
	l-Hyoscyamin	6,85	$1,1 \cdot 10^{-4}$	213	55,8
	Atropin	6,84	$1,1 \cdot 10^{-4}$	178	63,1
62	Kontrolle	5,55	—	1063	—
	l-Hyoscyamin	5,55	$1,1 \cdot 10^{-4}$	600	43,6
	Atropin	5,55	$1,1 \cdot 10^{-4}$	615	42,1
	Kontrolle	7,56	—	109	—
	l-Hyoscyamin	7,57	$1,1 \cdot 10^{-4}$	59	45,9
	Atropin	7,56	$1,1 \cdot 10^{-4}$	61	44,0
63	Kontrolle	3,77	—	1025	—
	l-Hyoscyamin	3,77	$1,1 \cdot 10^{-4}$	1083	— 5,7
	Atropin	3,77	$1,1 \cdot 10^{-4}$	1028	— 0,3

Tabelle VII.

Versuchsnummer	Bezeichnung	p_H	Mole	Mittlere Konstante $k \cdot 10^5$	Hemmung in Proz.
21	Kontrolle	6,09	—	525	—
	Tropin I	6,07	$2,16 \cdot 10^{-4}$	458	12,8
	„ II	6,01	$6,48 \cdot 10^{-4}$	346	34,1

Tabelle VIII.

Versuchsnummer	Bezeichnung	p_H	Mole	Mittlere Konstante $k \cdot 10^5$	Hemmung in Proz.
21 a	Kontrolle	6,42	—	795	—
	Tropin I	6,41	$1 \cdot 10^{-4}$	706	11,2
	„ II	6,41	$2,2 \cdot 10^{-4}$	625	21,4
	„ III	6,37	$4,6 \cdot 10^{-4}$	526	33,8
	„ IV	6,34	$1 \cdot 10^{-3}$	398	49,9

Tabelle IX.

Versuchsnummer	Bezeichnung	p_H	Mole	Mittlere Konstante $k \cdot 10^5$	Hemmung in Proz.
21 b	Kontrolle	5,64	—	1162	—
	Tropin	5,61	$1 \cdot 10^{-3}$	809	30,4
	Kontrolle	6,29	—	792	—
	Tropin	6,25	$1 \cdot 10^{-3}$	509	35,8
	Kontrolle	7,50	—	149	—
	Tropin	7,48	$1 \cdot 10^{-3}$	91	38,9

bei welchem geometrisch abgestufte Tropinmengen bei sonst gleichen Bedingungen zur Verwendung gelangten, angenähert dem Logarithmus der Tropinkonzentration proportional (Abb. 8 und 8a).

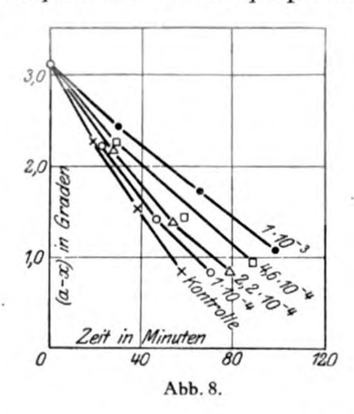


Abb. 8.

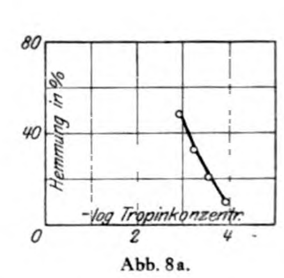


Abb. 8a.

Weniger ausgesprochen ist die Abhängigkeit der Tropinwirkung vom p_H: die p_H-Werte bewegen sich zwischen 5,61 und 7,50, während die zugehörigen Tropinhemmungen nur zwischen 30,4 und 38,9 Proz., d. h. noch fast innerhalb der Fehlergrenzen schwanken (Tabelle IX).

Daß das Tropin viel schwächer als das Atropin wirkt, lehrt Tabelle X, 1, welche Vergleichsversuche mit Atropin und Tropin enthält. Atropin wirkt ungefähr vier- bis fünfmal so stark wie Tropin in äquimolekularer Konzentration (bei p_H 6,2).

Wenn man äquimolekulare Mengen Tropin und Tropasäure den Inversionsversuchen zusetzt — die Tropasäure für sich ist ganz ohne Wirkung, die ausführliche Mitteilung der negativen Versuche mag unterbleiben — und den Einfluß der Mischung mit dem des Tropins vergleicht, so ergibt sich auch hier die Wirkungslosigkeit der Tropasäure. Die Tropinwirkung ist in diesen Versuchen (Tabelle X, 2) nicht verändert.

Tabelle X. Zusammenstellung der Ergebnisse bei Tropin.

Versuchsnummer	Bezeichnung	p_H	Mole	Mittlere Konstante $k \cdot 10^5$	Hemmung in Proz.
	1. Vergleich mit Atropin.				
22	Kontrolle	6,26	—	846	—
	Atropin	6,26	$2 \cdot 10^{-4}$	261	69,1
	Tropin	6,25	$2 \cdot 10^{-4}$	688	18,7
23	Kontrolle	6,13	—	684	—
	Atropin	6,13	$1{,}8 \cdot 10^{-4}$	246	64,0
	Tropin	6,13	$1{,}8 \cdot 10^{-4}$	581	15,1
24	Kontrolle	6,15	—	820	—
	Atropin	6,11	$1 \cdot 10^{-4}$	377	54,0
	Tropin	5,98	$1 \cdot 10^{-4}$	722	11,7
	2. Vergleich mit Tropasäure.				
24	Kontrolle	6,15	—	820	—
	Tropin	5,98	$1 \cdot 10^{-4}$	722	11,7
	Tropin + Tropasäure	5,92	je $1 \cdot 10^{-4}$	715	12,8
25	Kontrolle	6,28	—	584	—
	Tropin	6,28	$1 \cdot 10^{-4}$	553	5,3
	Tropin + Tropasäure	6,26	je $1 \cdot 10^{-4}$	545	6,7

D. Versuche mit Scopolamin.

Beim Scopolamin wurde der Einfluß seiner Konzentration untersucht und gleichzeitig ein Vergleich seiner Wirkung mit der des Atropins angestellt. Es ergibt sich, daß auch das Scopolamin die Invertasewirkung angenähert dem Logarithmus seiner Konzentration proportional hemmt, und daß seine Wirkung nur wenig schwächer als die einer äquimolekularen Atropinmenge ist. So bewirkt im gleichen Versuch 10^{-4} Mol Atropin eine Hemmung von 52,9 Proz., Scopolamin in der gleichen molaren Menge eine Hemmung von 47,5 Proz. Die Werte für die Hemmungen verschiedener Scopolaminkonzentrationen enthält Tabelle XI, 2; in der üblichen Weise graphisch dargestellt ist der Versuch in den Abb. 9 und 9a.

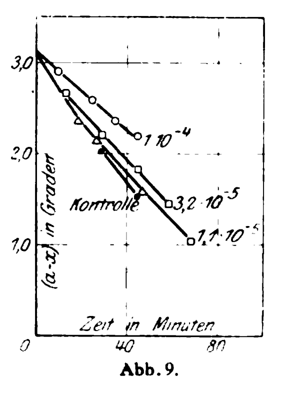


Abb. 9.

Ferner stellten wir die Abhängigkeit der Wirkung vom p_H fest (Tabelle XI, 1, u. Abb. 10). Die Giftwirkungn immt hier ebenfalls mit steigendem p_H zu in ungefähr der gleichen Weise, wie dies beim Atropin und beim Hyoscyamin der Fall ist.

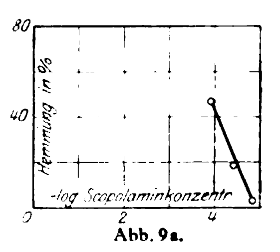


Abb. 9a.

Schließlich wurde die Reversibilität der Scopolaminvergiftung mittels der Dialysiermethode folgendermaßen festgestellt:

Tabelle XI.

Zusammenstellung der Ergebnisse bei Scopolamin.
Abhängigkeit der Hemmung von p_H.

Versuchsnummer	Bezeichnung	p_H	Mole	Mittlere Konstante $k \cdot 10^5$	Hemmung in Proz.
		I.			
28	Kontrolle	4,26	—	999	—
	Scopolamin	4,27	$1 \cdot 10^{-4}$	948	5,1
	Kontrolle	5,66	—	836	—
	Scopolamin	5,68	$1 \cdot 10^{-4}$	551	34,1
	Kontrolle	6,63	—	479	—
	Scopolamin	6,62	$1 \cdot 10^{-4}$	268	44,1
29	Kontrolle	5,24	—	918	—
	Scopolamin	5,15	$1 \cdot 10^{-4}$	730	20,5
	Kontrolle	5,62	—	841	—
	Scopolamin	5,59	$1 \cdot 10^{-4}$	566	32,7
	Kontrolle	6,22	—	638	—
	Scopolamin	6,20	$1 \cdot 10^{-4}$	331	48,1
26	Kontrolle	6,25	—	631	—
	Scopolamin	6,25	$1 \cdot 10^{-4}$	331	47,5
		II.			
	Kontrolle	6,25	—	631	—
	Atropin	6,25	10^{-4}	297	52,9
	Scopolamin I	6,26	$1,1 \cdot 10^{-5}$	620	1,7
	„ II	6,23	$3,2 \cdot 10^{-5}$	508	19,5
	„ III	6,25	10^{-4}	331	47,5

(Gruppe I: Abb. 10. — Gruppe II: Abb. 9 u. 4.)

Reversibilität der Scopolaminwirkung.

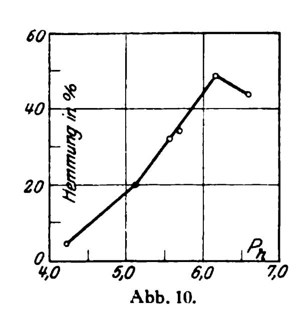


Abb. 10.

Wie beim Atropin wurden auch hier vier Fermentportionen zu 10 ccm abgemessen und davon zwei (C_I, C_{II}) mit je 5 ccm H_2O vermischt, zwei andere (A_I, A_{II}) mit je 5 ccm einer Lösung, die in 25 ccm 0,6072 g Scopolamin HBr enthielt. Jeder Portion wurden 2 ccm entnommen und für den Fermentversuch verwendet.

C_I $p_H = 6,47$ $k \cdot 10^5 = 498$,
A_I $p_H = 6,51$ $k \cdot 10^5 = 388$,
C_{II} $p_H = 6,48$ $k \cdot 10^5 = 498$,
A_{II} $p_H = 6,51$ $k \cdot 10^5 = 433$.

Die Hemmung beträgt 18,7 Proz.

Nach dreitägiger Dialyse der vier Portionen gegen Leitungswasser wird der Inhalt jeder der vier Hülsen in einen 25-ccm-Meßkolben gespült und mit H_2O bis zur Marke aufgefüllt. Von diesen Lösungen wurden je 10 ccm zu Fermentversuchen verwendet. Da C_I und A_I in diesem Stadium

verunglückten, können nur die Ergebnisse der beiden Proben C_{II} und A_{II} mitgeteilt werden.

$$C_{II}\ p^{H} = 6{,}56 \quad k \,.\, 10^5 = 1075,$$
$$A_{II}\ p_{H} = 6{,}57 \quad k \,.\, 10^5 = 1072.$$

Hieraus geht die Reversibilität der Scopolaminhemmung hervor.

Tabelle XII.

Versuchsnummer	Bezeichnung	p_H	Mole	Mittlere Konstante $k \,.\, 10^5$	Hemmnng in Proz.
76	Kontrolle	6,44	—	768	—
	Atropinmethylbromatum I .	6,42	$5 \,.\, 10^{-5}$	494	37,0
	„ II .	6,42	$1{,}1 \,.\, 10^{-4}$	370	52,3
	„ III	6,42	$2{,}3 \,.\, 10^{-4}$	302	61,0
	„ IV	6,42	$5 \,.\, 10^{-4}$	224	71,0

Als letztes der mit dem Atropin verwandten Alkaloide wurde noch das Atropinmethylbromat geprüft, und zwar nur in bezug auf seine Wirkung bei geometrisch abgestuften Konzentrationen. Tabelle XII sowie Abb. 11 und 11a enthalten diesen Versuch, welcher die angenäherte Proportionalität der Hemmung zum Logarithmus der Giftkonzentration erkennen läßt.

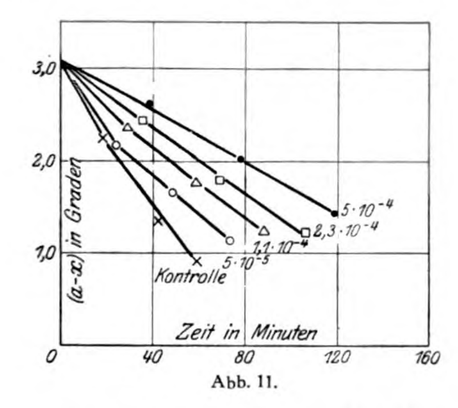


Abb. 11.

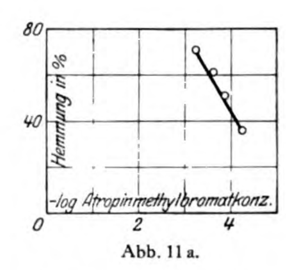


Abb. 11 a.

Die Ergebnisse der Versuche, die mit Alkaloiden, die dem Atropin nahestehen, angestellt wurden, lassen sich kurz dahin zusammenfassen, daß diese Substanzen, wenn sie überhaupt die Invertase beeinflussen, prinzipiell in der gleichen Weise wie Atropin wirken. Nur bei dem Tropin hat sich im Gegensatz zu den anderen wirksamen Körpern innerhalb des untersuchten p_H-Bereichs eine nur geringe Abhängigkeit seiner Wirkung von der Wasserstoffionenkonzentration feststellen lassen. Tropin wirkt (bei p_H 6,2) 4 bis 5 mal schwächer als Atropin; Tropasäure ist unwirksam.

Versuche mit Körpern der Cocaingruppe.

Cocainversuche.

Nachdem festgestellt war, daß Cocain die Invertasewirkung hemmt (Tabelle XIII, Versuch 30), wurde der Einfluß verschiedener Cocainkonzentrationen auf die Invertasewirkung geprüft. Es stellte sich heraus, daß, wie Tabelle XIII, Versuche 32 und 33, sowie Abb. 12a, 13 und 13a erkennen lassen, auch hier wieder geradlinige Abhängigkeit der Hemmung vom Logarithmus der Cocainkonzentration besteht.

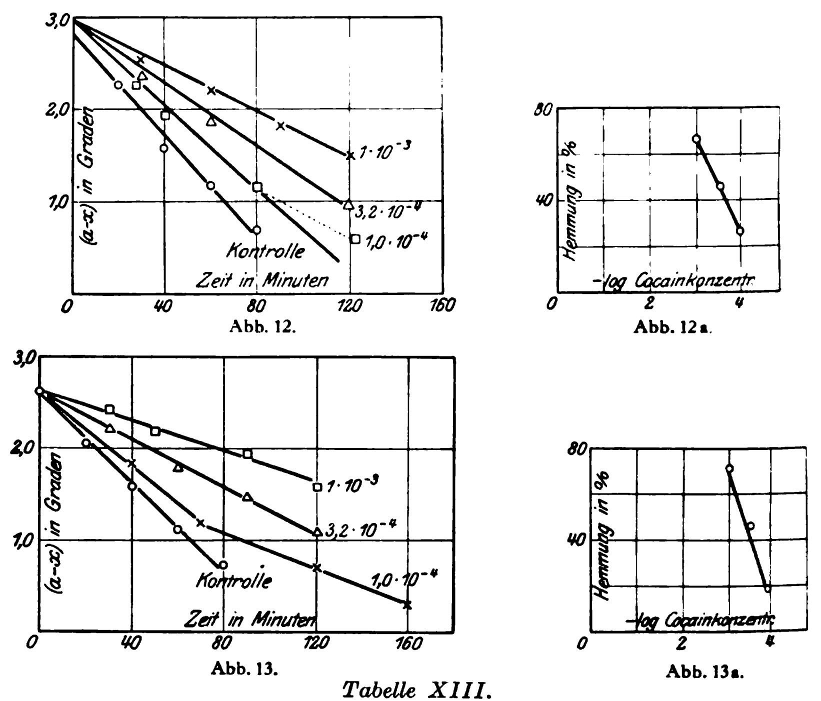


Abb. 12. Abb. 12a.

Abb. 13. Abb. 13a.

Tabelle XIII.

Zusammenfassung der Cocainwirkung. Abhängigkeit von der Konzentration.

Versuchsnummer	Bezeichnung	p_H	Mole	Mittlere Konstante	Hemmung in Proz.
30	Kontrolle	5,97	—	711	—
	Cocain	5,97	1 . 10−4	537	24,5
32	Kontrolle	6,02	—	640	— (Abb. 12a.)
	Cocain I	5,98	1 . 10−4	470	26,6
	„ II	5,98	3,2 . 10−4	335	47,7
	„ III	5.98	1 . 10−3	214	66,6
33	Kontrolle	6,42	—	616	— (Abb. 13a.)
	Cocain I	6,37	1 . 10−4	495	19,6
	„ II	6,37	3,2 . 10−4	328	46,75
	„ III	6,37	1 . 10−3	173	71,9

Tabelle XIV. Zusammenfassung der Cocainwirkung. Abhängigkeit von p_H.

Versuchsnummer	Bezeichnung	p_H	Mole	Mittlere Konstante	Hemmung in Proz.	
32	Kontrolle	6,02	—	640	—	
	Cocain	5,98	3,2 . 10−4	335	47,7	
33	Kontrolle	6,42	—	616	—	
	Cocain	6,37	3,2 . 10−4	328	46,75	
64	Kontrolle	5,54	—	979	—	
	Cocain	5,54	3,2 . 10−4 *)	626	36,1	
64	Kontrolle	7,58	—	114	—	
	Cocain	7,51	3,2 . 10−4 *)	104	8,8	
65	Kontrolle	5,50	—	612	—	Abb. 14.
	Cocain	5,47	3,2 . 10−4	408	33,3	
65	Kontrolle	6,15	—	547	—	
	Cocain	6,15	3,2 . 10−4	324	40,7	
65	Kontrolle	6,79	—	323	—	
	Cocain	6,77	3,2 . 10−4	193	40,3	
69	Kontrolle	7,60	—	107	—	
	Umschaltung	5,62	—	381	—	
	Cocain	7,60	2 . 10−4	98	8,4	
	Umschaltung	5,62	—	301	21,0	
70	Kontrolle	6,46	—	402	—	
	d, ψ-Cocain	6,46	2 . 10−4	261	35,1	
	l-Cocain	6,44	2 . 10−4	260	35,3	
	Kontrolle	5,84	—	355	—	
	d, ψ-Cocain	5,86	4 . 10−4	230	35,2	
	l-Cocain	5,82	4 . 10−4	249	30,0	

*) Abscheidung von Cocain.

Bezüglich des Verhaltens der Cocainwirkung dem p_H gegenüber ist ein Gegensatz zu den bisher untersuchten Alkaloiden festzustellen (Tabelle XIV, Abb. 14). Es zeigt sich nämlich, daß die Cocainhemmung bei p_H-Werten um 6,0 herum ein Maximum aufweist und daß die Kurve bei weiterer p_H-Zunahme rasch absinkt. Dieses Verhalten erscheint darin begründet zu sein, daß die Cocainbase schon bei relativ geringer Alkalität ausfällt.

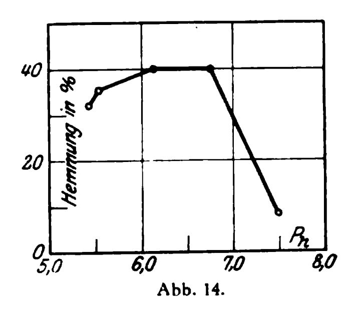


Abb. 14.

Mit diesem Ergebnis stimmt ein Versuch überein, der nach Art der ersten, bei den Atropinversuchen geschilderten Methode zum Nachweis der Reversibilität der Giftwirkung angestellt wurde (Tabelle XIV, Versuch 69). Der Versuch wurde bei hoher Alkalität begonnen. Die Cocainhemmung betrug hier 8,4 Proz. Nach dem Ansäuern bis auf ein p_H von 5,62 schnellte die Cocainhemmung auf 21 Proz.

Vergleich der l-Cocainwirkung mit der eines seiner optischen Isomeren.

Von den optischen Isomeren des Cocains hatten wir das d. ψ-Cocain zur Verfügung. (Dies ist nicht der optische Antipode des l-Cocains.)

Der Vergleich beider Cocaine ergab in zwei Versuchen Übereinstimmung der Wirkung innerhalb der Fehlergrenzen (Tabelle XIV, Versuch 70).

Schließlich wurde die Reversibilität der Cocainwirkung mittels der Dialysiermethode geprüft.

Reversibilität der Cocainhemmung.

1,0478 g d, ψ-Cocainbase werden in Salzsäure gelöst, neutralisiert und die Lösung auf 25 ccm aufgefüllt. Je 5 ccm dieser Lösung werden mit zweimal je 10 ccm unserer Fermentlösung versetzt (Portionen A_I und A_{II}), während zweimal je 10 ccm Fermentlösung mit je 5 ccm H_2O vermischt werden (Portionen C_I und C_{II}). Ein Vergleich der Wirkung der vier Portionen geht aus folgenden Zahlen hervor, wobei zum Versuch von den Mischungen je 2 ccm verwendet wurden:

C_I $p_H = 6{,}55$ $k = 287$,
A_I $p_H = 6{,}55$ $k = 275$,
C_{II} $p_H = 6{,}55$ $k = 356$,
A_{II} $p_H = 6{,}55$ $k = 270$.

Daraus ergibt sich eine durchschnittliche Hemmung von 13,1 Proz.

Die Portionen wurden nun 4 Tage gegen Leitungswasser dialysiert, dann der Inhalt der Dialysierhülsen in ein 25 ccm-Meßgefäß gespült und mit H_2O bis zur Marke aufgefüllt. Von diesen Lösungen wurden je 10 ccm für je einen Fermentversuch verwendet, deren Ergebnisse folgende sind:

C_I $p_H = 6{,}58$ $k = 203$,
A_I $p_H = 6{,}58$ $k = 234$,
C_{II} $p_H = 6{,}59$ $k = 232$,
A_{II} $p_H = 6{,}59$ $k = 202$.

Die Übereinstimmung sämtlicher $k \cdot 10^5$ Werte beweist die Reversibilität der Cocainvergiftung.

Tabelle XV.

Versuchs-nummer	Bezeichnung	p_H	Mole	Mittlere Konstante $k \cdot 10^5$	Hemmung in Proz.
34	Kontrolle	6,15	—	695	—
	l-Ecgonin I	6,13	$1 \cdot 10^{-4}$	695	—
	„ II	5,97	$1 \cdot 10^{-3}$	689	0,86
34a	Kontrolle	6,14	—	770	—
	l-Ecgonin	6,12	$1 \cdot 10^{-3}$	729	5,0
68	Kontrolle	6,12	—	393	—
	d-Ecgonin I	6,17	$1 \cdot 10^{-4}$	421	—
	„ II	6,14	$2{,}2 \cdot 10^{-4}$	415	—
	„ III	6,12	$4{,}6 \cdot 10^{-4}$	403	—
	„ IV	5,73	$1 \cdot 10^{-3}$	366	6,9

Von den Spaltprodukten des Cocains haben wir das Ecgonin, und zwar in beiden optischen Modifikationen, untersucht. Eine Wirkung

auf die Invertase konnte trotz Verwendung großer Ecgoninmengen nicht völlig sichergestellt werden, so daß auch Unterschiede zwischen den beiden optischen Antipoden nicht auffindbar waren. Erschwerend bei diesen Versuchen ist die hohe Acidität des freien Ecgonins (Tabelle XV).

Wenn man von der Beeinflussung der Cocainwirkung auf die Invertase durch das p_H absieht — die hierbei beobachteten Abweichungen beruhen wahrscheinlich auf der geringen Löslichkeit der Cocainbase —, so ergibt sich, daß die Cocainversuche dieselben Ergebnisse liefern wie die Atropinversuche, indem die Wirkung dem Logarithmus der Konzentration des Cocains angenähert proportional, die Vergiftung reversibel und unabhängig von der optischen Konfiguration des Moleküls ist. Das Radikal Ecgonin ist so gut wie unwirksam, und zwar gleichfalls unabhängig von der optischen Konfiguration.

Versuche mit Morphin.

Die auf Tabelle XVI sowie in den Abb. 15 und 16a dargestellten Versuche mit Morphin in geometrisch abgestufter Progression ergeben die bei allen bisher von uns untersuchten Alkaloiden gefundene Abhängigkeit der Hemmung vom Logarithmus der Konzentration.

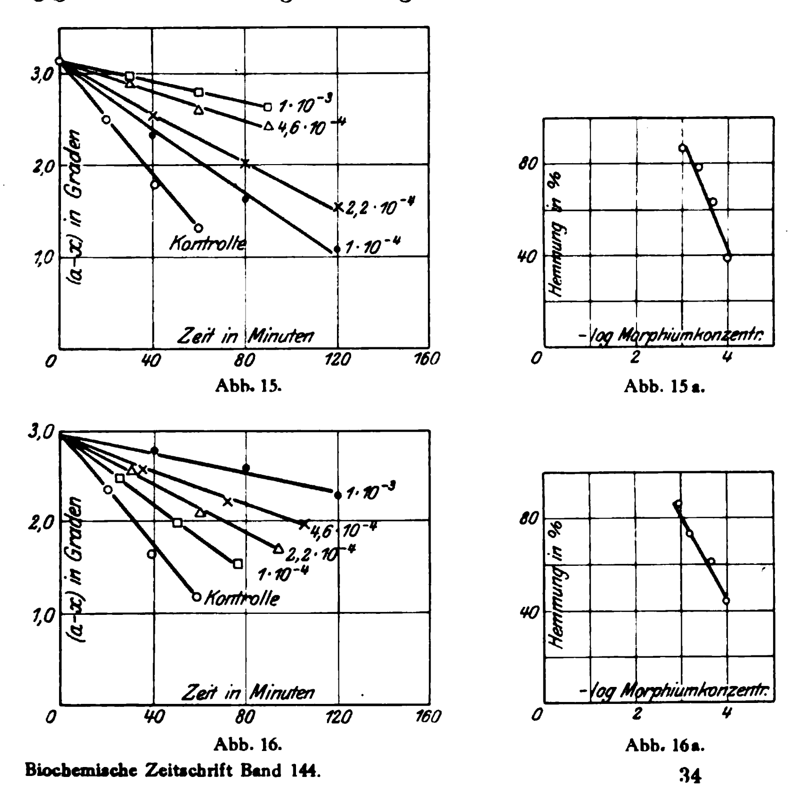


Abb. 15.

Abb. 15a.

Abb. 16.

Abb. 16a.

Tabelle XVI. Morphium.

Zusammenstellung der Resultate.

Versuchsnummer	Bezeichnung	p_H	Mole	Mittlere Konstante $k \cdot 10^5$	Hemmung in Proz.
	1. Abhängigkeit der Giftwirkung von der Konzentration.				
35	Kontrolle	6,33	—	559	—
	Morphium I	6,40	$1 \cdot 10^{-4}$	346	38,3 (Abb. 15a.)
	„ II	6,40	$2{,}2 \cdot 10^{-4}$	239	57,3 (Abb. 15a.)
	„ III	6,22	$4{,}6 \cdot 10^{-4}$	117	79,3 (Abb. 15a.)
	„ IV	6,22	$1 \cdot 10^{-3}$	77	86,5 (Abb. 15a.)
36	Kontrolle	6,41	—	617	—
	Morphium I	6,41	$1 \cdot 10^{-4}$	343	44,5 (Abb. 16a.)
	„ II	6,39	$2{,}2 \cdot 10^{-4}$	236	61,1 (Abb. 16a.)
	„ III	6,39	$4{,}6 \cdot 10^{-4}$	170	72,8 (Abb. 16a.)
	„ IV	6,34	$1 \cdot 10^{-3}$	78	87,5 (Abb. 16a.)
	2. Abhängigkeit der Giftwirkung vom p_H.				
35	Kontrolle	6,33	—	559	—
	Morphium	6,40	$1 \cdot 10^{-4}$	346	38,3
36	Kontrolle	6,41	—	617	—
	Morphium	6,41	$1 \cdot 10^{-4}$	343	44,3
37	Kontrolle	5,59	—	893	—
	Morphium	5,58	$1 \cdot 10^{-4}$	701	22,0 (Abb. 17.)
37	Kontrolle	6,15	—	856	—
	Morphium	6,13	$1 \cdot 10^{-4}$	512	40,1 (Abb. 17.)
37	Kontrolle	6,88	—	418	—
	Morphium	6,88	$1 \cdot 10^{-4}$	197	53,0 (Abb. 17.)
38	Kontrolle	6,57	—	605	—
	Morphium	6,56	$1 \cdot 10^{-4}$	296	50,6 (Abb. 17.)
38	Kontrolle	6,76	—	528	—
	Morphium	6,75	$1 \cdot 10^{-4}$	254	52,4 (Abb. 17.)
38	Kontrolle	7,11	—	302	—
	Morphium	7,11	$1 \cdot 10^{-4}$	160	47,0 (Abb. 17.)

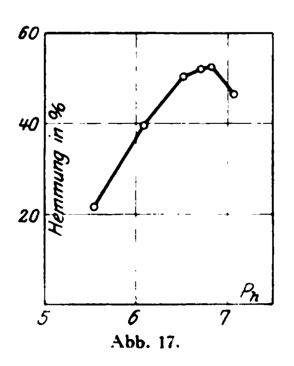


Abb. 17.

Die Abhängigkeit von dem p_H ist auf derselben Tabelle und der zugehörigen Abb. 17 gezeigt. Auch hier besteht eine Zunahme der Hemmung mit Zunahme des p_H.

Die Reversibilität wurde nach der ersten, bei den Atropinversuchen erwähnten Methode mit dem Ergebnis geprüft, daß eine Reversibilität unter den innegehaltenen Bedingungen nicht sicher erweisbar ist (Tabelle XVII), während die Prüfung nach der Dialysiermethode die bestehende Reversibilität ergab.

Tabelle XVII.

Versuchsnummer	Bezeichnung	p_H	Mole	Mittlere Konstante $k \cdot 10^5$	Hemmung in Proz.
67	Kontrolle	7,49	—	100	—
	Umschaltung	5,62	—	362	—
	Morphium	7,49	$2 \cdot 10^{-4}$	84	16
	Umschaltung	5,62	$2 \cdot 10^{-4}$	287	20,7

Prüfung der Reversibilität der Morphinhemmung.

1,0593 g Morphin HCl wurden in 25 ccm H_2O gelöst und von dieser Lösung je 5 ccm, entsprechend 0,2119 g Morphin HCl, mit zwei Portionen unseres Ferments von 10 ccm versetzt. Diese beiden Portionen werden als A_I und A_{II} bezeichnet. Zwei weitere Fermentportionen von 10 ccm werden mit je 5 ccm H_2O versetzt und als C_I und C_{II} bezeichnet. Aus jeder Portion werden 2 ccm entnommen und untersucht. Es ergab sich (übliche Versuchsanordnung):

$$C_I \; p_H = 6{,}87 \quad k \cdot 10^5 = 239,$$
$$A_I \; p_H = 6{,}83 \quad k \cdot 10^5 = 185,$$
$$C_{II} \; p_H = 6{,}84 \quad k \cdot 10^5 = 300,$$
$$A_{II} \; p_H = 6{,}84 \quad k \cdot 10^5 = 192.$$

Die durchschnittliche Hemmung des Morphins beträgt 37 Proz.

Die Reste der Fermentportionen werden in Dialysierhülsen gebracht und 4 Tage gegen Leitungswasser dialysiert, dann der Inhalt der Hülsen je in einen Meßkolben gespült und auf 25 ccm aufgefüllt. Die Prüfung ergab unter Verwendung von 10 ccm des Ferments:

$$C_I \; p_H = 6{,}58 \quad k \cdot 10^5 = 559,$$
$$A_I \; p_H = 6{,}59 \quad k \cdot 10^5 = 549,$$
$$C_{II} \; p_H = 6{,}59 \quad k \cdot 10^5 = 566,$$
$$A_{II} \; p_H = 6{,}58 \quad k \cdot 10^5 = 554.$$

Damit ist die Reversibilität der Morphinhemmung erwiesen.

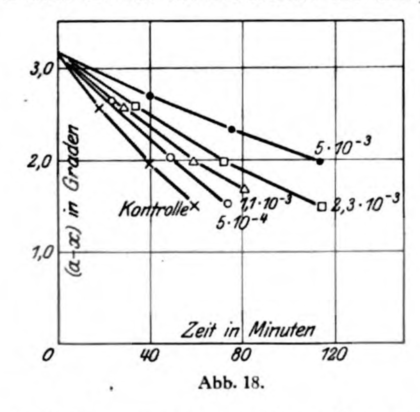


Abb. 18.

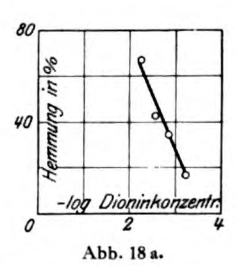


Abb. 18a.

Es folgen nun einige Versuche mit Morphinderivaten, Kodein und Dionin; von diesen beiden wurde zunächst die Hemmung mit derjenigen einer äquimolekularen Morphinmenge verglichen, wobei sich

(Tabelle XVIII) ergibt, daß Morphin und Kodein ungefähr gleich stark, Dionin nur ganz unwesentlich schwächer wirken. Bei Änderung der Konzentration der beiden Alkaloide bleibt ihre Hemmung dem Logarithmus der Konzentration angenähert proportional (Tabelle XIX und Abb. 18, 19 und 19a).

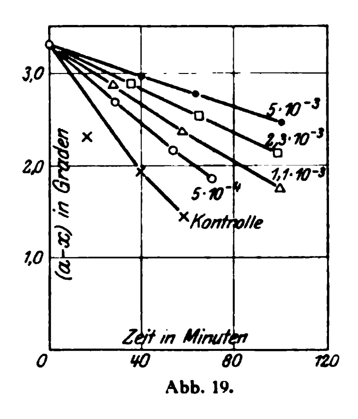


Abb. 19.

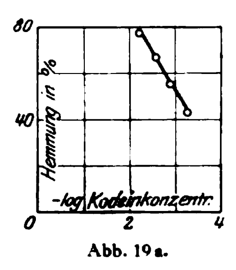


Abb. 19a.

Tabelle XVIII.

Versuchsnummer	Bezeichnung	p_H	Mole	Mittlere Konstante $k \cdot 10^5$	Hemmung in Proz.
72	Kontrolle	5,80	—	601	—
	Morphium	5,84	$2 \cdot 10^{-4}$	354	41,1
	Dionin	5,80	$2 \cdot 10^{-4}$	408	32,1
	Kodein	5,78	$2 \cdot 10^{-4}$	357	40,6

Tabelle XIX.

Versuchsnummer	Bezeichnung	p_H	Mole	Mittlere Konstante $k \cdot 10^5$	Hemmung in Proz.
73	Kontrolle	6,42	—	478	—
	Dionin I	6,38	$5 \cdot 10^{-4}$	386	19,2
	„ II	6,39	$1,1 \cdot 10^{-3}$	311	34,9
	„ III	6,37	$2,3 \cdot 10^{-3}$	268	43,9
	„ IV	6,37	$5 \cdot 10^{-3}$	169	64,5
74	Kontrolle	6,38	—	582	—
	Kodein I	6,35	$5 \cdot 10^{-4}$	334	42,6
	„ II	6,35	$1,1 \cdot 10^{-3}$	256	56,0
	„ III	6,31	$2,3 \cdot 10^{-3}$	186	68,0
	„ IV	6,30	$5 \cdot 10^{-3}$	125	78,5

Versuche mit Pilocarpin.

Tabelle XX.

Zusammenstellung der Resultate. Abhängigkeit der Giftwirkung von p_H.

Versuchsnummer	Bezeichnung	p_H	Mole	Mittlere Konstante $k \cdot 10^5$	Hemmung in Proz.
58	Kontrolle	5,56	—	1035	—
	Pilocarpin	5,66	$1 \cdot 10^{-4}$	535	48,5
	Kontrolle	6,00	—	883	—
	Pilocarpin	6,05	$1 \cdot 10^{-4}$	332	62,4
	Kontrolle	6,40	—	711	—
	Pilocarpin	6,43	$1 \cdot 10^{-4}$	202	71,6
59	Kontrolle	6,37	—	632	—
	Pilocarpin	6,40	$1 \cdot 10^{-4}$	205	67,6
	Kontrolle	7,04	—	260	—
	Pilocarpin	7,02	$1 \cdot 10^{-4}$	89	65,8
	Kontrolle	7,52	—	105	—
	Pilocarpin	7,56	$1 \cdot 10^{-4}$	35	66,7

Die Wirkung des Morphins und seiner Derivate entspricht also genau der Wirkung des Atropins.

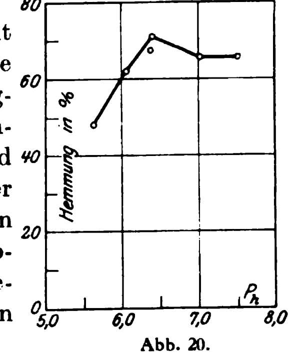


Abb. 20.

Beim Pilocarpin wurde die Abhängigkeit der Hemmung von der Giftkonzentration sowie der Einfluß des p_H untersucht. Die Abhängigkeit der Hemmung von der Pilocarpinkonzentration zeigen Tabelle XXI und Abb. 21 und 21a. Die Hemmung hängt hier in ähnlicher Weise wie beim Atropin und beim Morphin mit der Konzentration zusammen; beim Pilocarpin scheint indessen die logarithmische Beziehung das Verhalten schlechter als bei den anderen Alkaloiden wiederzugeben.

Bei der Prüfung der p_H-Wirkung auf das Pilocarpin wurde Zunahme der Hemmung mit Zunahme des p_H festgestellt (Tabelle XX, Abb. 20).

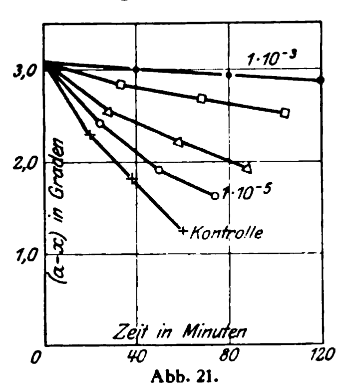


Abb. 21.

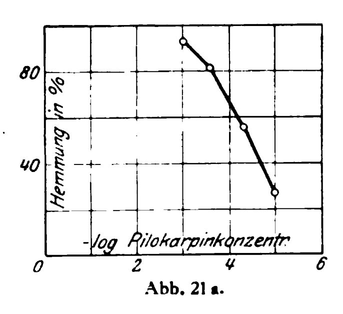


Abb. 21a.

Tabelle XXI.

Versuchsnummer	Bezeichnung	p_H	Mole	Mittlere Konstante $k \cdot 10^5$	Hemmung in Proz.
46	Kontrolle	6,42	—	542	—
	Pilocarpin I	6,43	$1 \cdot 10^{-5}$	386	28,8
	„ II	6,43	$1 \cdot 10^{-4,34}$	242	56,3
	„ III	6,45	$1 \cdot 10^{-3,67}$	97,3	81,8
	„ IV	6,50	$1 \cdot 10^{-3}$	28,7	94,5

Tabelle XXII.

Versuchsnummer	Bezeichnung	p_H	Mole	Mittlere Konstante $k \cdot 10^5$	Hemmung in Proz.
45a	Kontrolle	6,36	—	682	—
	Cotarnin	6,37	$2 \cdot 10^{-4}$	290	57,5
	Pilocarpin	6,42	$2 \cdot 10^{-4}$	100	85,3
	Berberin	6,29	$2 \cdot 10^{-4}$	183	73,2
	Novocain	6,38	$2 \cdot 10^{-4}$	354	48,1

Schließlich seien noch einige orientierende Versuche mit den Alkaloiden Cotarnin, Berberin und Novocain angeführt, die mit Pilocarpin verglichen wurden und deren Wirkung bei dem p_H des Versuchs (Tabelle XXII) sich schwächer als die des Pilocarpins erwies.

Alkaloidvergiftungen gereinigter Invertase.

Wir kommen nunmehr zu einer weiteren Versuchsreihe, bei welcher das Ferment nach der Methode von *Willstätter* und *Racke* einer Reinigung unterzogen worden war. Es handelte sich für uns darum, festzustellen, ob unsere Ergebnisse, die an Versuchen mit dem ungereinigten Ferment angestellt waren, nicht etwa von Zufälligkeiten der das Invertin begleitenden Ballaststoffe beeinflußt waren. Es mußte also zunächst die Abhängigkeit der Wirkung der „reinen" Invertase vom p_H geprüft und weiter ein Vergleich unter Verwendung von Alkaloiden mit ungereinigtem Ferment angeschlossen werden.

Versuche mit gereinigtem Invertin.

Reinigungsmethode: 300 ccm der ursprünglichen Invertinlösung wurden mit 300 ccm einer $Al(OH)_3$-Aufschwemmung nach *Willstätter* versetzt und zu der Mischung 150 ccm Alkohol zugefügt. Nach dem Filtrieren resultierte ein deutlich gelbes Filtrat, das keine invertierenden Eigenschaften mehr erkennen ließ. Der Filterrückstand wurde nach mehrfachem Waschen mit destilliertem Wasser in Wasser aufgeschwemmt, auf ein Volumen von 300 ccm gebracht und von dieser Aufschwemmung 2 ccm zur Feststellung des Invertingehaltes entnommen. Nachdem eine befriedigende Inversion festgestellt war, wurde mittels HNa_2PO_4 in sehr geringen Mengen das Enzym eluiert. Die ganz schwach gelblich gefärbte Flüssigkeit invertierte weniger stark als die Ausgangslösung, was durch

die Volumzunahme beim Eluieren, sowie durch die beim Reinigen unvermeidlichen Verluste erklärt ist.

Mit dieser verdünnten Lösung des gereinigten Ferments wurden folgende Vorversuche angestellt:

1. Prüfung der Abhängigkeit der Wirkung vom p_H.

Versuch	1.	p_H 5,47	$k = 358$.
,,	2.	p_H 6,40	$k = 248$.
,,	3.	p_H 7,40	$k = 75$.
,,	4.	p_H 7,97	$k = 31$.

Diese vier Versuche sind in der Abb. 22 dargestellt. Der Verlauf ist fast geradlinig, so daß die einzelnen Geschwindigkeiten für den Vergleich benutzt werden können. Setzt man die Geschwindigkeit des Versuchs 1 gleich 100, so betragen die übrigen Geschwindigkeiten 69,3, 21, 8,6. Diese relativen Geschwindigkeiten als Funktion des zugehörigen p_H aufgetragen, ergeben die Abb. 23.

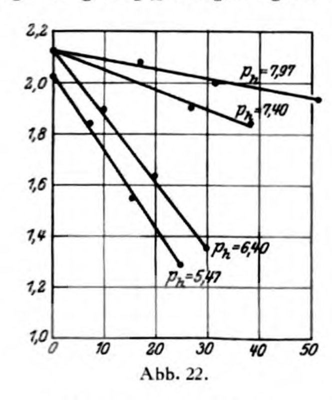


Abb. 22.

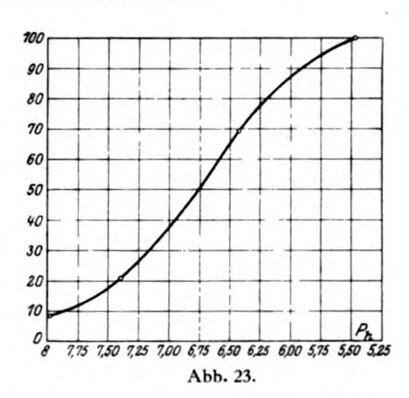


Abb. 23.

2. Vergleich der Wirkung gleicher Alkaloidmengen auf gleich wirksame Mengen ungereinigten und gereinigten Ferments.

Zunächst wurde ermittelt, welche Mengen beider Fermente gleich stark invertieren. Dann wurde je eine Kontrolle und je ein Hauptversuch mit 10^{-4} Mol Hyoscyamin angestellt.

Bezeichnung	p_H	Mole	Ferment	Mittlere Konstante $k \cdot 10^5$	Hemmung in Proz.
Kontrolle	6,98	—	ungereinigt	448	—
Hyoscyamin . . .	6,98	10^{-4}	„	254	43,3
Kontrolle	6,98	—	gereinigt	377	—
Hyoscyamin . . .	6,98	10^{-4}	„	244	35,3

Bei einem weiteren derartigen Versuch ergab sich eine noch bessere Übereinstimmung zwischen den beiden Hemmungen.

Kontrolle	5,29	—	ungereinigt	368	—
Hyoscyamin . . .	5,29	$7 \cdot 10^{-5}$	„	259	35,0
Kontrolle	5,29	—	gereinigt	377	—
Hyoscyamin . . .	5,34	$7 \cdot 10^{-5}$	„	258	31,5

Nachdem diese Vorversuche die Gleichartigkeit des gereinigten Ferments ergeben hatten, wurde sein Verhalten verschiedenen Giftkonzentrationen gegenüber geprüft. Das hierzu verwendete Alkaloid war Hyoscyamin; Atropin war uns nicht zugänglich, bei der vorher nachgewiesenen völligen Identität der Hyoscyamin- und Atropinwirkung auf Invertin können wir die mit Hyoscyamin gewonnenen Resultate unbedenklich auf das Atropin übertragen.

Tabelle XXIII.

Wirkung verschiedener Hyoscyaminkonzentrationen auf gereinigtes Invertin.

Bezeichnung	p_H	Mole	Mittlere Konstante $k \cdot 10^5$	Hemmung in Proz.
Kontrolle	7,03	—	500	—
Hyoscyamin I	7,02	$1 \cdot 10^{-5}$	472	5,6
„ II	7,0	$2,2 \cdot 10^{-5}$	427	14,6
„ III	7,0	$4,6 \cdot 10^{-5}$	397	20,6
„ IV	7,0	10^{-4}	293	41,4

Die Hemmungen sind in der Abb. 24 als Funktion des Logarithmus der Hyoscyaminmengen aufgetragen, woraus sich die Abhängigkeit als angenähert proportional dem Logarithmus der Konzentration des Alkaloids erweist. In einem zweiten derartigen Versuch war die Übereinstimmung eine noch bessere (vgl. Versuch 64, Abb. 25).

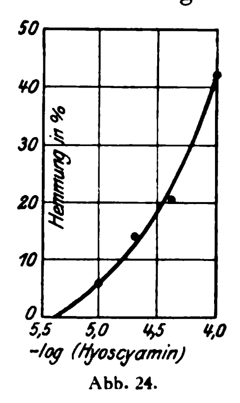


Abb. 24.

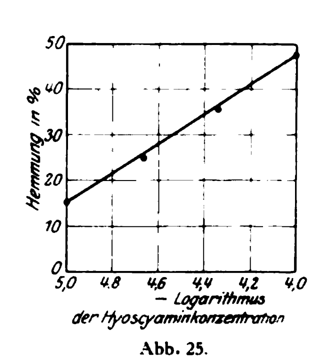


Abb. 25.

Versuch 64.

Der Versuch wurde in der gleichen Weise wie der vorstehende angestellt. Das p_H betrug in sämtlichen Proben 7,07.

Bei 10^{-5} Mol Hyoscyamin betrug die Hemmung 15,5 Proz.
„ $2,2 \cdot 10^{-5}$ „ „ „ „ „ 24,7 „
„ $4,6 \cdot 10^{-5}$ „ „ „ „ „ 35,8 „
„ 10^{-4} „ „ „ „ „ 48,0 „

Der Versuch ist in der Abb. 25 graphisch dargestellt; es ist offenbar, daß die Hemmung geradlinig vom Logarithmus der Hyoscyaminkonzentration abhängt.

Aus diesen Versuchen mit gereinigtem Ferment geht hervor, daß die der ungereinigten Invertase beigemengten Ballaststoffe offenbar keinen Einfluß auf die Wirkung des Hyoscyamins haben. Es ist demnach gestattet, unsere Ergebnisse an ungereinigter Invertase auch als für die gereinigte gültig anzusehen.

Diese lassen sich dahin zusammenfassen, daß die von uns untersuchten Alkaloide zwar quantitative Verschiedenheiten in ihrer Wirkung erkennen lassen, daß also das eine stärker, das andere schwächer hemmt, daß hingegen die Art der Wirkung bei ihnen übereinstimmt. Es ist stets angenähert die logarithmische Abhängigkeit der Hemmung von der Alkaloidkonzentration, die gleichartige Abhängigkeit der Hemmung einer konstanten Alkaloidmenge vom p_H (soweit, wie beim Cocain, nicht besondere Komplikationen dazwischen traten) und schließlich bei allen daraufhin untersuchten Substanzen Reversibilität ihrer Wirkung gefunden worden. Änderung der optischen Konfiguration hatte bei drei daraufhin geprüften Vertretern (d, l-Atropin, l-Hyoscyamin; l-Cocain, d, ψ-Cocain; l-Ecgonin, d-Ecgonin) weder qualitative noch quantitative Änderung der Hemmungswirkung bei der Invertase zur Folge. Spaltprodukte, soweit sie uns zur Prüfung zugänglich waren, waren von sehr geringer bzw. ohne Wirkung. Namentlich sei hervorgehoben, daß Tropin viel schwächer als Atropin wirkt, und Tropasäure (unter vergleichbaren Bedingungen) überhaupt unwirksam gefunden worden ist. Auch die Mischung aequimolarer Mengen von Tropin und Tropasäure hatte keine größere Wirkung als Tropin für sich. — Ferner fanden wir bei den Cocainversuchen das Radikal Ecgonin unabhängig von der optischen Konfiguration so gut wie unwirksam, während Cocain sehr wirksam war. Beim Morphin und seinen Substitutionsprodukten konnte eine geringe quantitative Änderung der Wirkung durch Ersatz von Wasserstoff des Alkaloids durch Äthoxyl gefunden werden.

Humorale Übertragbarkeit von Nervenreizen beim Warmblüter.

Von

L. Jendrassik (Budapest).

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Groningen.)

(Eingegangen am 17. Oktober 1923.)

Mit 10 Abbildungen im Text.

Nachdem durch die Versuche von *Loewi*[1]) am Froschherzen, und von *Brinkman* und *van Dam*[2]) am Herz-Magenpräparat die Möglichkeit einer humoralen Übertragbarkeit der Vagus- und Sympathicuswirkung festgestellt war, war es eine wichtige Frage, ob sich dieses Phänomen auch am überlebenden Warmblüterorganismus nachweisen läßt. Der Zweck vorliegender Untersuchung war zu erproben, ob auch beim Säugetier nach Reizung des Vagus Stoffe mit entsprechend spezifischer Wirkung freikommen. Als Versuchstier diente das Kaninchen; die Anordnung war dem *Brinkman-van Dam*schen Froschexperiment analog, nur wurde die Herzflüssigkeit anstatt am Magen, am isolierten *Dünndarm* des Kaninchens untersucht.

Methodik.

Nachdem das Tier durch Nackenschlag getötet war, wurde der Thorax geöffnet und in die Aorta eine mit der Durchströmungsflüssigkeit gefüllte Kanüle eingeführt. An den Rändern der beiden Herzohren, ebenso wie an der Arteria pulmonalis, wurden kleine Einschnitte gemacht, um den freien Abfluß der Flüssigkeit zu sichern.

Die Durchströmungsflüssigkeit, die unter einem Druck von 70 bis 90 cm Wasserhöhe durch das Herz floß, hatte die folgende Zusammensetzung: NaCl 0,9 Proz., KCl 0,42 Proz., $CaCl_2$ 0,24 Proz., $NaHCO_3$ 0,02 Proz., Glucose 0,1 Proz.

Nach Beginn der Durchströmung werden die beiden Halsvagi hoch auspräpariert, ihr unterer Teil bleibt aber in dem samt dem Herzen heraus-

---

1) *O. Loewi*, Pflügers Arch. **189**, 239, 1921; **193**, 201, 1921.

2) *Brinkman* und *van Dam*, ebendaselbst **196**, 66, 1922; vgl. auch *H. J. Hamburger*, Vortrag bei der Eröffnung des Biological Buildings of *McGills* University in Montreal (Canada) im September 1922; auch Klin. Wochenschr., 2. Jahrg., Nr. 28, 1923.

genommenen mediastinalen Gewebe liegen. Die Aortenkanüle wird dann am Stativ befestigt und die beiden Vagi auf Platinelektroden gelegt.

Die aus dem Herzen abtropfende Flüssigkeit wird in Mengen von 10 ccm in markierten Reagenzgläsern aufgefangen. Die Präparation soll möglichst schnell erfolgen, weil der Vagus oft innerhalb 15 Minuten unerregbar wird. Die faradische Reizung geschah mittels eines *Dubois*schen Induktoriums, das mit einem Akkumulator von 2 Volt gespeist wurde, bei einem Rollenabstand, welcher genügte, um vollständigen Herzstillstand hervorzurufen.

Der Darm wurde von demselben Kaninchen sofort nach dem Tode entnommen, in Tyrodelösung ausgespült und ein kleines Stückchen des-

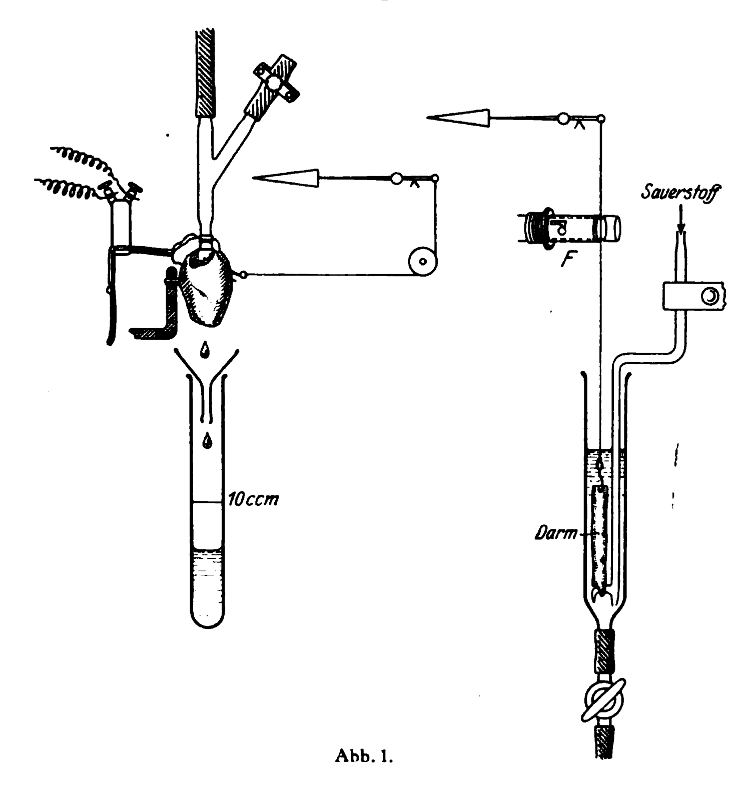


Abb. 1.

selben in Tyrode suspendiert (s. Abb. 1). Die Flüssigkeit konnte durch den Hahn abgelassen und durch die obere Öffnung mit neuer ersetzt werden. Während des Abfließens wurde der Suspensionsfaden bei dilatiertem Darme mit dem Apparat *F* fixiert. So bildet der Flüssigkeitswechsel keinen mechanischen Reiz und stört die Bewegungen nicht.

In einer Ringerlösung mit 0,02 Proz. $NaHCO_3$ zeigt der Darm nur schwache automatische Bewegungen; es wurde daher als Flüssigkeit die Tyrodelösung verwendet und die Herzflüssigkeit durch Zufügung einer Ergänzungslösung im Verhältnis 1 : 10 in Tyrodelösung verwandelt. Diese Ergänzungslösung bestand aus NaH_2PO_4 0,05 Proz., $NaHCO_3$ 0,8 Proz.

und $MgCl_2$ 0,1 Proz. Die erhaltene Tyrodelösung war daher: NaCl 0,81 Proz., KCl 0,038 Proz., $CaCl_2$ 0,022 Proz., $MgCl_2$ 0,01 Proz., Glucose 0,09 Proz., NaH_2PO_4 0,005 Proz., $NaHCO_3$ 0,1 Proz.

Die Bewegungen des Kaninchendarms sind in der Tyrodelösung sehr regelmäßig und von konstanter Hubhöhe; wird aber nach einiger Zeit die Flüssigkeit durch frische Lösung gewechselt, dann sieht man die Bewegungen kleiner werden und oft den Tonus absinken. Diese Erscheinung rührt wahrscheinlich vom Ausspülen des Cholins her, kann aber beim Suchen nach darmerregenden Substanzen nicht irreführen, da der Effekt hier dem Gesuchten entgegengerichtet ist. Wird außerdem die Flüssigkeit in kurzen Zeiträumen (2 bis 4 Minuten) gewechselt, dann wird dabei die Darmtätigkeit fast gar nicht beeinflußt.

Die Untersuchungen wurden im Zimmer für Körpertemperatur ausgeführt.

Versuchsergebnisse.

War nun das Herz an der Kanüle mit Durchströmungsflüssigkeit befestigt, so wurden mit kurzen Zwischenräumen Proben von 10 ccm der ausfließenden Durchströmungsflüssigkeit aufgefangen. Diese haben auf den Darm gewöhnlich keine Wirkung. Nun wurde der N. vagus des Herzens während 1 bis 5 Minuten gereizt; das Herz reagierte darauf mit einem kürzeren oder längeren totalen Stillstand, wonach die stets frequenter werdenden Einzelzuckungen durchbrachen. Inzwischen wurde die abfließende Flüssigkeit wieder in Portionen von 10 ccm auf-

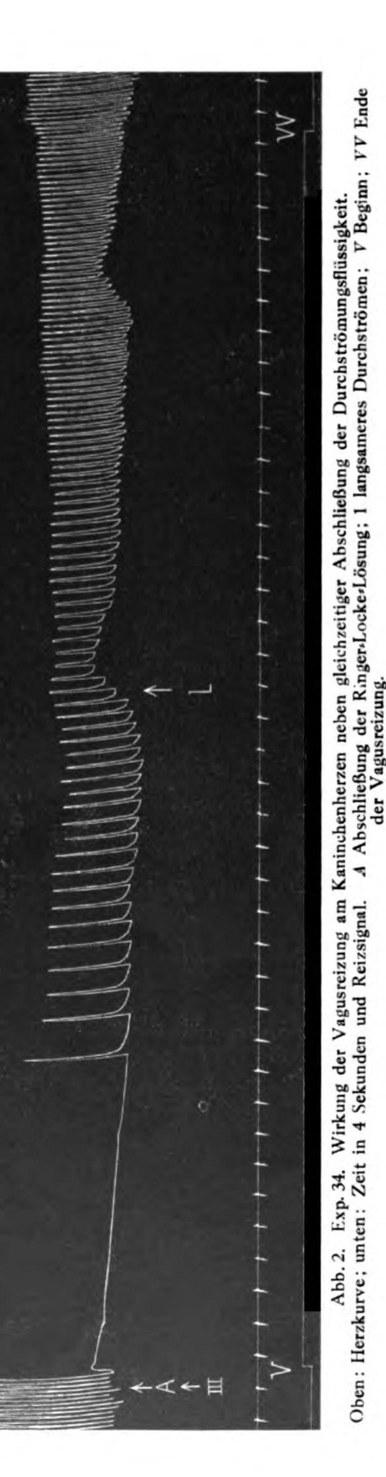


Abb. 2. Exp. 34. Wirkung der Vagusreizung am Kaninchenherzen neben gleichzeitiger Abschließung der Durchströmungsflüssigkeit. Oben: Herzkurve; unten: Zeit in 4 Sekunden und Reizsignal. *A* Abschließung der Ringer-Locke-Lösung; *l* langsameres Durchströmen; *V* Beginn; *VV* Ende der Vagusreizung.

gefangen[1]). Die Wirkung dieser Flüssigkeit auf den Darm war praktisch negativ. Unter sechs Fällen hatten die Flüssigkeitsportionen viermal

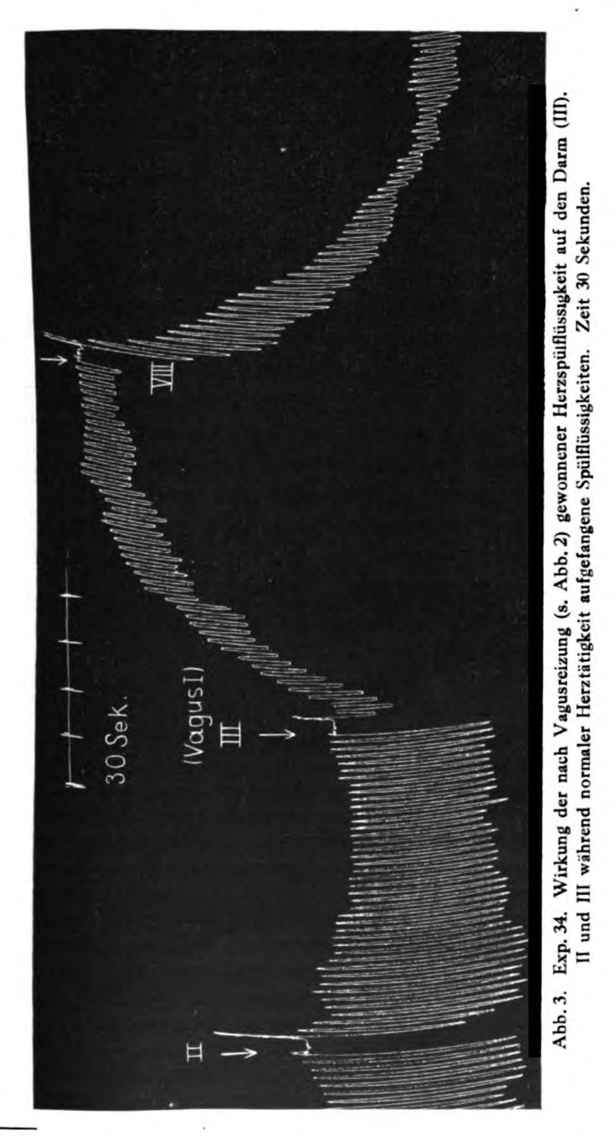


Abb. 3. Exp. 34. Wirkung der nach Vagusreizung (s. Abb. 2) gewonnener Herzspülflüssigkeit auf den Darm (III). II und III während normaler Herztätigkeit aufgefangene Spülflüssigkeiten. Zeit 30 Sekunden.

[1]) In den ersten Versuchen wurde noch der *Brinkman*schen Versuchsanordnung gefolgt. Die vom Herzen abfließende Flüssigkeit wurde durch einen mit Trichter versehenen Schlauch unmittelbar (durch die untere Öffnung) in das Darmgefäß geleitet. Dieses Verfahren zeigte sich hier aber nicht brauchbar, unter anderem, weil die Herzflüssigkeit in Tyrodelösung umgewandelt werden mußte.

gar keinen Effekt auf den Darm; nur zweimal war eine Andeutung einer erregenden Wirkung vorhanden.

Es lag auf der Hand, diesen negativen Erfolg der starken Verdünnung der möglicherweise ausgewaschenen Reizsubstanzen zuzuschreiben. Um also eine stärkere Konzentrierung dieser Substanzen zu ermöglichen, wurden die Versuche derart ausgeführt, daß gleichzeitig mit dem Einsetzen der Vagusreizung die Durchströmungsflüssigkeit oberhalb des Herzens abgeschlossen wurde (vgl. Abb. 2). Nach einer kürzeren oder längeren Reizperiode wurde dann der Zufluß wieder geöffnet, aber nicht ganz, nur so, daß die Flüssigkeit das Herz nur langsam durchströmte. Wurden bei der Vagusreizung durch die Durchströmungsflüssigkeit tatsächlich Reizsubstanzen ausgespült, so mußten diese bei der neuen Versuchsanordnung in der aufgefangenen Flüssigkeit in einer größeren Konzentration anwesend sein. Dementsprechend wurde nun die Flüssigkeit nach Herzvagusreizung unter acht Fällen siebenmal mehr oder weniger wirksam auf den Darm befunden, indem sie die Spontanbewegungen verstärkte oder den Tonus erhöhte (vgl. Abb. 3). In zwei Fällen steigerte sich die Tonuszunahme bis zur stärkeren Kontraktur. Bloß ein Versuch verlief vollkommen negativ (Nr. 33). In einem anderen (Nr. 27) hatte die vor der Vagusreizung aufgefangene Flüssigkeit auch eine deutlich erregende Wirkung, so daß auch dieser Versuch eigentlich nicht beweisend ist.

Die Resultate werden am besten gezeigt durch die Beschreibung des Verlaufes der einzelnen Versuche.

Experiment 23. 10. März 1923.

3h 03. Kaninchen durch Nackenschlag getötet. Präparation wie angegeben.
3h 17. Normale Herztätigkeit; Flüssigkeit aufgefangen.
3h 18. Vagusreizung, Dauer 86 Sekunden, davon 30 Sekunden völliger Stillstand. 15 Sekunden nach Beginn der Reizung wird die Herzdurchströmung abgeschlossen; 4 Sekunden nach Beendigung der Reizung wieder Anfang der Durchströmung und Auffangen von 10 ccm Vagusreizflüssigkeit (2).
Darm. 3h 44. Darm seit einer halben Stunde in Tyrode; Flüssigkeitswechsel mit Tonusabnahme und Verkleinerung der Bewegungen.
3h 48 und 3h 50. Kein Einfluß auf den Darm.
3h 54. Erste Herzflüssigkeit (vor der Reizung) ins Darmgefäß geführt. Sehr kleine Tonussteigerung und schwache Vergrößerung der Bewegungen.
3h 57. Flüssigkeit (2) (nach Vagusreizung). Weitere Tonussteigerung.
4h. Flüssigkeit (3), einige Zeit nach der Reizung aufgefangen. Abnahme des Tonus.
4h 03. Flüssigkeit 4 } (etwas längere Zeit nach der Reizung entnommen).
4h 07. „ 5 } So gut wie ohne Wirkung.

Ergebnis: Die Vagusflüssigkeit verursacht eine sehr schwache Tonussteigerung (die schwächste Wirkung unter allen ausgeführten Experimenten).

Experiment 29. 15. März 1923.

4^h35. Nackenschlag. 4^h44. Erste Flüssigkeit aufgefangen.

4^h45. Vagus 68 Sekunden gereizt. Ringer abgesperrt 8 Sekunden nach Beginn der Reizung (zweite Flüssigkeit aufgefangen). Flüssigkeiten 3 bis 5 während normaler Herztätigkeit nach Ende der Reizung aufgefangen.

4^h47. Zweite Vagusreizung, 46 Sekunden; Absperrung der Durchströmungsflüssigkeit während der Reizung; Flüssigkeit 7. Flüssigkeiten 8 bis 10, normale Herztätigkeit nach der zweiten Reizung.

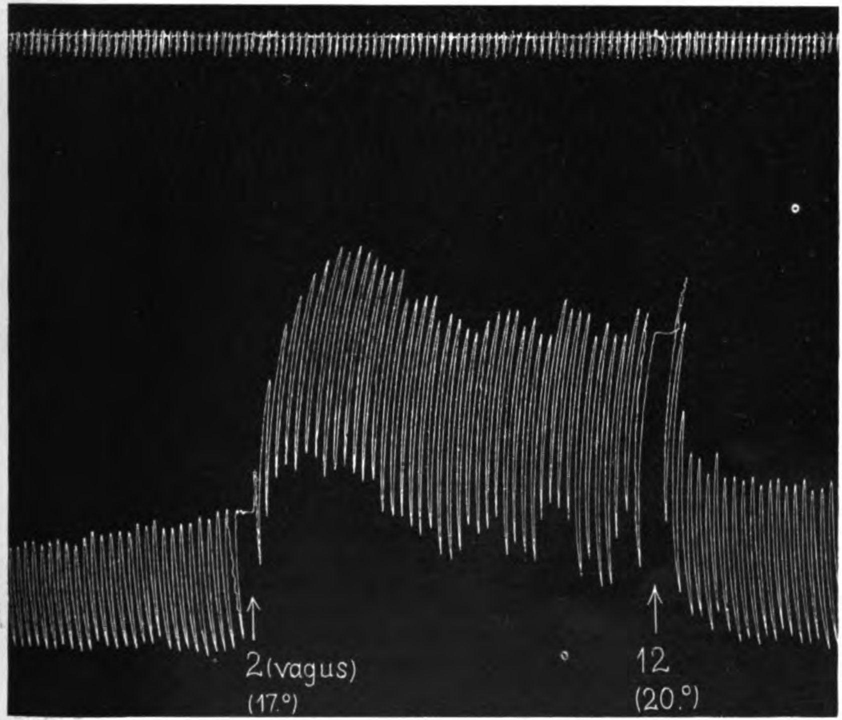


Abb. 4. Exp. 29. Wirkung der nach Vagusreizung gewonnenen Herzflüssigkeit auf den Darm (bei 2). Vor (2) und nach (12) Wirkung von während normaler Herztätigkeit aufgefangener Spülflüssigkeiten. Zeit in 4 Sekunden.

5^h. Flüssigkeiten 11 bis 13.

Darm. Seit 4^h16 in Tyrode. 5^h12 Fixierung für 10 Minuten verursacht keine Änderung.

5^h13. Flüssigkeit 13, die Bewegungen sinken auf ein Drittel der Hubhöhe.

5^h17. Flüssigkeit 2 (nach erster Vagusreizung) Kontraktur.

5^h20. Flüssigkeit 12 schnelles Herabsinken auf das frühere Niveau (vgl. Abb. 4).

5^h27. Flüssigkeit 7 (zweite Vagusreizung) wirkt eher etwas lähmend. Ebenso wirken 10 und 11. 1, 6, 3 haben keinen Einfluß.

Ergebnis: Die Herzflüssigkeit der *ersten Vagusreizung* wirkt stark *erregend* auf den Darm; die während der zweiten Vagusreizung aufgefangene ist unwirksam (wirkt sogar etwas lähmend).

Experiment 32. 19. März 1923.

12h. Nackenstich. Vagusreizung 8 Minuten nach dem Tode. Abschließung der Locke-Flüssigkeit und Vagusreizung während 80 Sekunden, davon Herzstillstand 40 Sekunden. Nach Aufhören des Stillstandes Durchströmung allmählich wieder angefangen. Flüssigkeiten 3 bis 4 werden unmittelbar nach der Vagusreizung aufgefangen.

12h 20. Abschließen der Durchströmungsflüssigkeit ohne Vagusreizung für 1 Minute, Flüssigkeit 7.

Am *Darm* ist Flüssigkeit 3 unwirksam, 4 ergibt Tonuszunahme, 7 ergibt Tonusabnahme.

Ergebnis: Flüssigkeit nach Vagusreizung erhöht den Darmtonus, Flüssigkeit nach Abschließung ohne Vagusreizung erniedrigt den Tonus.

Experiment 33. 19. März 1923.

3h. Nackenstich. 3h 08 Vagusreizung. Nur der linke Vagus. 100 Sekunden Reizung, davon Stillstand während 60 Sekunden. Abschluß der Durchströmungsflüssigkeit gleichzeitig mit Beginn der Reizung. Nach 60 Sekunden allmähliches Einlassen der Flüssigkeit.

Flüssigkeit 3 während der Reizung entnommen.

Flüssigkeit 4 am Ende der Reizung entnommen.

Auf dem *Darm* ist keine Wirkung zu ersehen.

Ergebnis negativ.

Experiment 34. 20. März 1923.

12h 30. Nackenstich. 12h 37 Vagusreizung während 160 Sekunden, davon 40 Sekunden Stillstand (Flüssigkeit 3). Abschluß der Durchströmungsflüssigkeit beim Anfang der Reizung, nach 80 Sekunden langsamer, nach 200 Sekunden voller Durchfluß. Flüssigkeiten 4 und 5 während des Abschlusses nach Beendigung der Vagusreizung. Flüssigkeit 8 während normal gewordener Herztätigkeit (vgl. Abb. 2).

Flüssigkeiten 11 und 12 Abschluß ohne Vagusreizung, 90 Sekunden. Dann allmählich wieder Durchströmung, Flüssigkeiten 13 und 14.

Am *Darm* gibt Flüssigkeit 3 (Vagusperiode) eine starke Kontraktur, welche auf Zufügung von Flüssigkeit 8 auf das frühere Niveau zurücksinkt (vgl. Abb. 3).

Flüssigkeiten 1, 2, 12 sind ohne Einfluß.

Flüssigkeit 11 (Abschluß ohne Vagusreizung) Tonusabfall.

Ergebnis: Starke Kontraktur am Darm durch die Vagusflüssigkeit; Spülflüssigkeit bei Abschluß ohne Vagusreizung ergibt Lähmung des Darmes.

Experiment 35. 21. März 1923.

2h 30. Nackenstich. 2h 37 bis 2h 40 Herzflüssigkeit 1 bis 6.

2h 40. Vagusreizung während 6 Minuten. Völliger Stillstand während 172 Sekunden, beim Anfang der Reizung Abschluß des Ringers. Nach Erscheinen der ersten Kontraktion Durchfluß allmählich wieder angefangen. Während der Reizung Flüssigkeiten 7 bis 10.

Auf den *Darm* wirkt Flüssigkeit 7 sehr schwach tonuserhöhend; 8 und 9 sind ohne Einfluß; 10 gibt deutliche Kontraktur.

Ergebnis: Die letzte Portion der Vagusflüssigkeit wirkt deutlich erregend.

Experiment 36. 21. März 1923.

4^h30. Nackenstich. 4^h38 Vagusreizung, Dauer 256 Sekunden, Herzstillstand 68 Sekunden. Während der ganzen Reizung kein Durchfluß.
Flüssigkeit 1 bis 4 vor der Vagusreizung, 5 während und unmittelbar nach der Reizung, 6 und 7 bei langsamem Durchfluß.
Darm: Flüssigkeit 5 ergibt eine allmählich einsetzende deutliche Tonuszunahme.
Flüssigkeit 12: der Darm sinkt auf früheren Tonuszustand zurück.
Flüssigkeit 6 ergibt einen plötzlich eintretenden Tonusabfall, gefolgt durch allmähliche Zunahme.

Ergebnis: Tonussteigerung durch die Vagusflüssigkeit.

Experiment 27. 14. März 1923.

3^h. Nackenschlag. Flüssigkeit 1 vor der Vagusreizung, vom beigemengten Blute rosa gefärbt.
3^h10. Vagusreizung, 60 Sekunden, völliger Herzstillstand nur 6 Sekunden. 10 Sekunden nach Beginn der Reizung Ringer abgesperrt. Flüssigkeiten 3, 4, 5 während normaler Herztätigkeit.
Am *Darm* gibt schon Flüssigkeit 1 eine allmählich eintretende Kontraktur, ebenso Flüssigkeit 2. Beide Flüssigkeiten sind etwas rot gefärbt. Flüssigkeit 5 rasche Tonusabnahme.

Ergebnis: Hier ergab die Vagusflüssigkeit aber ebenso die vor der Reizung aufgefangene Tonussteigerung. Möglicherweise könnte diese Wirkung von Gerinnungssubstanzen herrühren. Dieser Versuch ist also nicht zu berücksichtigen.

Mit Ausnahme von Experiment 33 wurde daher in allen angestellten Versuchen am Darme eine reizende Wirkung der nach Vagusreizung aufgefangenen Reizflüssigkeit gefunden. Ein Unterschied zeigte sich noch darin, daß manchmal der erste Teil, machmal ein späterer Teil der aus dem Herzen kommenden Flüssigkeit den Darm reizte. Derartige Unterschiede können aber nicht wundernehmen, wenn man bedenkt, daß die untersuchten Stoffe nur nachzuweisen sind, wenn sie vom Ort der Bildung in die Durchspülflüssigkeit übertreten, wo sie überdies eine sehr weitgehende Verdünnung erfahren müssen.

Im Laufe der beschriebenen Versuche wurde wiederholt nachgewiesen, daß die aus dem normal schlagenden Herzen austretende Flüssigkeit den Darm nicht zu erregen vermag. Ebenso wurde gezeigt, daß das zeitweilige Abschließen des Ringers an und für sich keinen Anlaß zum Ausspülen von Reizsubstanzen gibt; im Gegenteil war die Wirkung auf den Darm eine lähmende. In allen diesen Versuchen aber

wurde diese kontrollweise ausgeführte Abschließung nach vorangehender Vagusreizung (mit Abschließung) erst im späteren Stadium des Versuchs vorgenommen. Es fragte sich noch, ob etwa eine Abschließung zu Beginn des Versuchs vorgenommen, keinen anderen Effekt ergeben würde.

Die hierüber ausgeführten Versuche zeigten, daß dies tatsächlich der Fall ist. Wie erwähnt, hatte die Flüssigkeit nach Abschließung in einem späteren Stadium des Versuchs eine lähmende Wirkung auf den Darm (vgl. Abb. 6). Hiergegenüber hatte die Flüssigkeit, die nach einer Abschließung am Anfang des Versuchs gewonnen wurde, keine

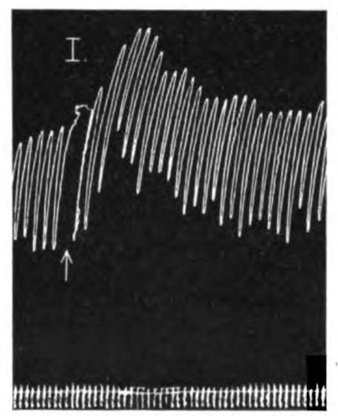


Abb. 5. Exp. 39. Wirkung während der ersten Abschließung gewonnener Herzflüssigkeit auf den Darm (bei *T*). Zeit in 4 Sekunden.

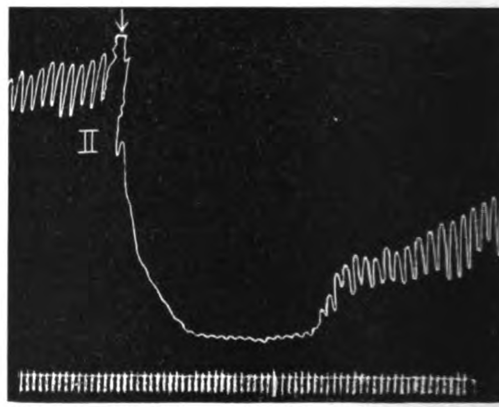


Abb. 6. Exp. 39. Wirkung während der zweiten Abschließung gewonnener Herzspülflüssigkeit auf den Darm (bei II). (Derselbe Versuch als bei Abb. 5).

oder eine schwach erregende Wirkung (vgl. Abb. 5). Es zeigte sich aber deutlich, daß diese erregende Wirkung nicht nur inkonstanter, sondern auch deutlich schwächer als die Wirkung der Flüssigkeiten nach Vagusreizung war.

Dahin kann doch als Resultat dieser Versuche mit großer Wahrscheinlichkeit zusammengefaßt werden, daß die gefundenen Reizsubstanzen wenigstens zum Teil infolge der Vagusreizung des Herzens freikommen, *und daß also auch beim Warmblüter eine humorale Übertragbarkeit von Nervenreizen besteht.*

Der erwähnte Gegensatz zwischen der Darmwirkung der Flüssigkeiten nach der ersten und der zweiten Abschließung scheint uns auch an und für sich nicht uninteressant. Von dem Standpunkte der Vagusfrage aus ist es auch beachtenswert, daß sich dieser Gegensatz in einem parallelen Verhalten des Herzens bei der ersten und zweiten Abschließung des Ringers offenbart.

Bei der ersten Abschließung nämlich, wo die aufgefangene Flüssigkeit am Darm wirkungslos ist (oder eine schwache erregende Wirkung zeigt),

nehmen Hubhöhe und Frequenz der Herzschläge allmählich ab. Bei dem zweiten Abschluß wirkt die Flüssigkeit lähmend auf den Darm. Beim Herzen zeigt sich nach dem Abschluß erst eine Zunahme der Hubhöhe (hauptsächlich durch Tieferwerden der diastolischen Erschlaffung).

Es seien diese Befunde in den folgenden Tabellen zusammengefaßt. R bezeichnet Reizung, L bezeichnet Lähmung des Darmes; + = Vergrößerung, — = Kleinerwerden der Hubhöhe.

Erster Abschluß der Durchspülflüssigkeit.

Datum	Experiment Nr.	Zeit nach dem Tode	Veränderung der Hubhöhe	Wirkung der Herzflüssigkeit an den Darm
29. III. 1923	39	15′	—	R
5. IV.	40	15	—	R
5. IV.	41	15	—	R
6. IV.	42	27	—	0
11. IV.	46	20	—	0

Zweiter Abschluß der Durchspülflüssigkeit.

Datum	Experiment Nr.	Zeit nach dem Tode	Veränderung der Hubhöhe	Wirkung der Herzflüssigkeit an den Darm
19. III. 1923	32	etwa 15′	+	L
20. III.	34	15	+	L
29. III.	39	$1^1/_4$h	+	L
5. IV.	40	50′	+	L (?)
5. IV.	41	2h	±	L
6. IV.	42	1	+	L
11. IV.	46	1	—	0

Die Herzflüssigkeiten zeigten sich aber noch in einigen anderen Fällen darmlähmend. So in den Versuchen 29 und 41, in späteren Stadien der Durchströmung, wo das Herz mit starker Inotropie arbeitete. In den Versuchen 40 und 42 war eine spontane Frequenzsteigerung zu beobachten, wo der Rhythmus sich ohne sichtbare Gründe auf das Zweifache erhöht hatte. Die nachher aus dem Herzen kommenden Spülflüssigkeiten hatten auf den Darm eine lähmende Wirkung.

Es ist möglich, daß die starke Inotropie und die Frequenzsteigerung durch die am Darm nachweisbare lähmende Substanz bedingt waren.

Wir geben jetzt noch einige Versuchsprotokolle, aus denen der oben angegebene Gegensatz zwischen Abschließung der Durchströmung im Anfang und in einem späteren Stadium des Versuches hervorgeht.

Experiment 41. 5. April 1923.

4h 03. Kaninchen durch Nackenschlag getötet.
4h 15. Frequenz 110 bis 120 (Flüssigkeit 1 und 2).
4h 18. Erste Abschließung (80 Sekunden Dauer). Die Kontraktionen werden kleiner, der Herzrhythmus wird auch schwächer. Langsamer Durchfluß 180 Sekunden (Flüssigkeiten 3 und 4).
5h 10. Zweite Abschließung (Dauer 120 Sekunden). Die Hubhöhe vergrößert sich. Langsamer Durchfluß 5 Minuten (Flüssigkeiten 3 und 4).

Flüssigkeiten 1 und 2 sind normale Flüssigkeiten während der normalen Herztätigkeit vor der zweiten Abschließung.
Am *Darm:* Flüssigkeiten 1 und 2 ohne Wirkung.
Flüssigkeit 3 allmähliche Kontraktur, was auf Flüssigkeit 9 schwindet.
Flüssigkeiten 1 und 2 ohne Wirkung.
Flüssigkeit 3 starke lähmende Wirkung.
Flüssigkeit 4 schwache lähmende Wirkung.

Ergebnis: 1. Abschließung: Herzkontraktionen werden kleiner, reizende Wirkung am Darm. 2. Abschließung: Herzkontraktionen werden größer, lähmende Wirkung am Darm.

Experiment 42. 6. April 1923.

2h 18. Kaninchen mit Nackenschlag getötet.
2h 30. Schwache Vagusreizung ohne Abschließung. Kein Herzstillstand, nur chronotrope und inotrope Wirkung: 2½ Minuten (Flüssigkeiten 4 und 5). Nach Aufhören der Reizung: starke Frequenzerhöhung (Flüssigkeiten 6 und 7).
2h 45. Flüssigkeit 8.
2h 47. Erste Abschließung. Hubhöhe zeigt kleine Frequenzverminderung (120 Sekunden). Langsamer Durchfluß 210 Sekunden (Flüssigkeiten 9 und 10). Voller Durchfluß: normale Herztätigkeit (Flüssigkeiten 11 bis 15).
3h 16. Zweite Abschließung. Dauer 90 Sekunden. Hubhöhe wird größer. Langsamer Durchfluß 120 Sekunden (Flüssigkeit 16). Voller Durchfluß (Flüssigkeiten 17 und 18). Hubhöhe normal.
4h 16. Dritte Abschließung. Hubhöhen verkleinern sich.
Am *Darm:* Flüssigkeiten 4 und 5 ohne Wirkung.
Flüssigkeit 7 lähmende Wirkung (Herz: Frequenzsteigerung).
Flüssigkeit 9: (Erste Abschließung) keine Wirkung.
Flüssigkeit 16: (Zweite Abschließung) Lähmung, Tonusabfall, auf kurze Zeit Aufhören der Spontanbewegungen.
Die anderen Flüssigkeiten haben keine Wirkung.

Ergebnis: 1. Abschließung: Herzkontraktionen werden kleiner, Flüssigkeit hat keine Wirkung am Darm. 2. Abschließung: Herzkontraktionen werden größer, Flüssigkeit wirkt lähmend auf den Darm. Die Flüssigkeit (7), die nach einer spontanen Rhythmussteigerung das Herz verlassen hatte, übte auch hier eine lähmende Wirkung am Darm aus.

Experiment 46. 11. April 1923.

3h 08. Kaninchen durch Nackenschlag getötet.
3h 15. Rhythmus des Herzens pro Minute 200 (Flüssigkeiten 1 und 2).
3h 28. Erste Abschließung: Dauer 3 Minuten (Flüssigkeit 3). Die Hubhöhe verkleinert sich.
3h 31. Langsamer Durchfluß (Flüssigkeit 3).
3h 32. Flüssigkeit 4.
3h 33. Voller Durchfluß (Flüssigkeit 5).
4h 05. Zweite Abschließung: Hubhöhe verkleinert sich, Frequenz vermindert (Flüssigkeit 9).

4^h07. Langsamer Durchfluß.
4^h07^5. Flüssigkeit 10.
4^h09. Voller Durchfluß (Flüssigkeit 11).
4^h11. Flüssigkeit 12 (normale Herztätigkeit).
Am *Darm:* Flüssigkeit 3 (vor der ersten Abschließung) keine Wirkung
Flüssigkeit 9 (vor der zweiten Abschließung) keine Wirkung.
Auch die übrigen Flüssigkeiten haben keine Wirkung.

Ergebnis: 1. Abschließung: Hubhöhe verkleinert sich; am Darm ist die Flüssigkeit ohne Wirkung. 2. Abschließung: Hubhöhe verkleinert sich; am Darm ist die Flüssigkeit ohne Wirkung.

Die Wirkung wässeriger Herzextrakte auf den Darm.

Wird vom Herzen bei Reizung des N. Vagus ein Stoff abgegeben, der — wie es vorangehend beschrieben wurde — auch auf andere Organe vagusreizend wirkt, so ist die Frage zu beantworten, ob dieser Stoff auf Wirkung des Vagus *entsteht*, oder schon *vorher anwesend* ist und die Vaguswirkung vielleicht nur durch sein Freikommen verursacht. Ist letzteres der Fall, ist der Stoff also schon von vornherein anwesend, so könnte er im Extrakte des Herzens nachweisbar sein. Aus diesem Grunde wurde die *Wirkung von Herzextrakten* am Darm untersucht, und zwar Vorhof und Kammer gesondert extrahiert.

Der *Vorhof* wurde mit einer Schere von den angrenzenden Herzteilen losgelöst, unter der Wasserleitung ausgespült, sodann in kleine Stückchen zerschnitten und in einem Porzellanmörser, nach Zufügung von 2 + 8 ccm Ringerlösung mit Quarzsand gut verrieben. Nach einigen Minuten wurde filtriert und das Filtrat dem Darme hinzugefügt (Abb. 7a, 7b, 7c, 7d).

Es verursachten 2 ccm des so hergestellten Vorhofextraktes (also ein fünftel Teil des ganzen Vorhofextraktes), zu 10 ccm Tyrode gefügt, eine *Erregung* am Darm, die bei allen untersuchten fünf Kaninchen deutlich war und bei einigen sogar zur starken Kontraktur führte. Abb. 7a zeigt die stärkste, Abb. 8 die schwächste Wirkung. Diese letztere stammt vom Herzen eines jungen Kaninchens.

Die Kontraktur kommt nach einer ziemlich großen Latenzperiode zustande. Außerdem sieht man gewöhnlich in den ersten Sekunden eine flüchtige lähmende Wirkung vorangehen. Die Reizwirkung des Vorhofextraktes ist auffallend stark und kommt mit der Wirkung eines ähnlichen Extraktes überein, der aus einem 3 bis 5 cm langen Darmstück (des Kaninchens) gewonnen wurde. (Kontrollweise war auch der gebrauchte Quarzsand untersucht, enthielt aber keine am Darm wirksame Verunreinigungen.) Ob der reizende Stoff Cholin sein könnte, ist bisher nicht untersucht worden. Er ist kein Kalium, nachdem seine Wirkung durch Atropin gehemmt werden kann.

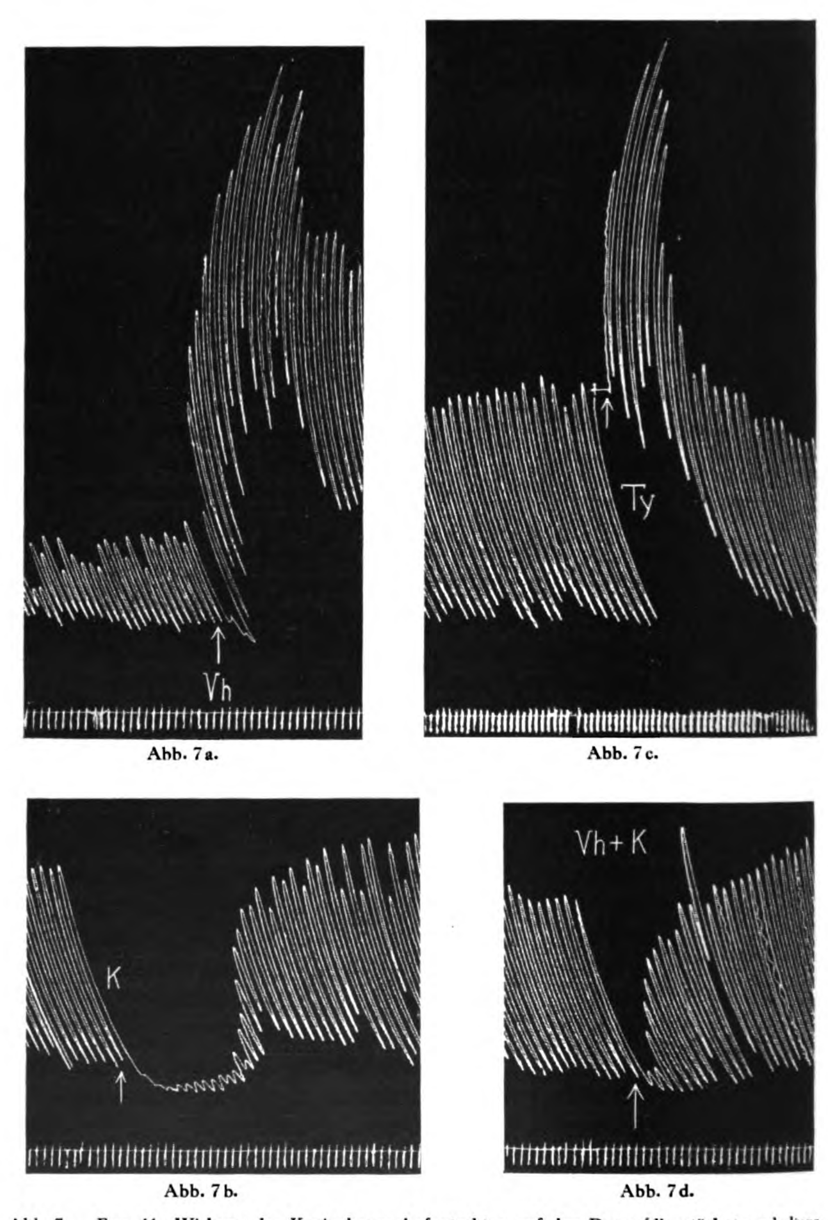


Abb. 7a.

Abb. 7c.

Abb. 7b.

Abb. 7d.

Abb. 7a. Exp. 44. Wirkung des Kaninchenvorhofextraktes auf den Darm (die stärkste erhaltene Wirkung). Bei *Vh* wird $^1/_5$ des ganzen Extraktes in 2 ccm dem Darm zugefügt. Zeit in 4 Sek.

Abb. 7b. Exp. 44. Wirkung des Herzkammerextraktes. Ca $^1/_{40}$ des ganzen Kammerextraktes bei *K* in 1 ccm zugefügt.

Abb. 7c. Exp. 44. 4 Minuten nach dem Kammerextrakt (Abb. 7b) wird dem Darm reine Tyrodelösung zugefügt.

Abb. 7d. Exp. 44. 2 ccm der Mischung desselben Vorhofs- und Kammerextraktes (*aa*).

Abb. 9 zeigt einen Versuch, wo dem Darm erst 1 ccm des Vorhofextraktes verabreicht wurde (ein zehntel Teil des ganzen Extraktes); das verursachte eine Kontraktion. Sodann wurden 0,5 mg Atropin sulf. zugefügt, worauf der Tonus auf das ursprüngliche Niveau zurückgesunken ist. Dieselbe Atropinmenge verursachte 6 Minuten nachher an demselben Darm (nachdem die Flüssigkeit zweimal gewechselt wurde) eine schwache Vergrößerung der Spontanbewegungen.

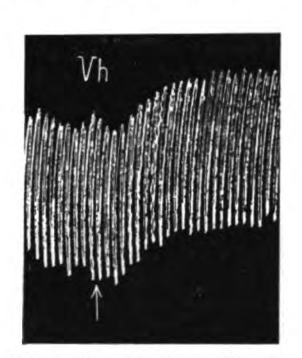


Abb. 8 Exp. 49. Darm. Das am schwächsten erregende Kaninchenvorhofextrakt. Junges Kaninchen. 1/5 des Vorhofextrakts in 2 ccm.

Wichtig erscheint uns der Umstand, daß der vagusreizende Stoff des Vorhofes während der Durchströmung — wenigstens zum Teil — ausgespült wird. Extrahiert man nämlich die Vorhöfe solcher Herzen, die längere Zeit (1 bis 1½ Stunde) mit Ringer-Locke-Lösung durchströmt waren, so erhält man nur eine sehr schwache, manchmal gar keine erregende Wirkung. An der Abb. 10 ist die Wirkung eines Vorhofextraktes sichtbar, welcher aus einem 1 Stunde 25 Minuten lang durchströmten Herz hergestellt wurde. Es tritt hier die lähmende Wirkung in Vordergrund und es erfolgt ein Tonusabfall. Erst nachher werden die Bewegungen etwas stärker und der Tonus nähert sich allmählich seinem früheren Zustande. Es war dies der Fall bei drei Kaninchen (Dauer der Durchströmung der zwei anderen Herzen vor der Extraktion 1 Stunde 10 Minuten bzw. 1 Stunde 42 Minuten). Bei einem vierten Vorhofextrakte (Dauer der vorangehenden Durchströmung 1 Stunde 07 Minuten) war eine Verstärkung der Bewegungen noch vorhanden, doch kam es nicht zu einer Kontraktur.

Abb. 9. Die Aufhebung der durch Vorhofextrakt verursachten Darmkontraktur durch Atropin. (Bei *Vh* der Vorhofextrakt, bei *A* 0,5 mg Atropin sulf. zugefügt.)

Ausnahme bildet nur ein Herz, das 1½ Stunde durchströmt und 3 Tage lang im Eisschrank aufbewahrt wurde; sein Extrakt erwies sich am Darm stark erregend. Es muß aber noch entschieden werden, ob nicht während des Aufbewahrens im Herzen darmreizende Stoffe entstehen können.

Die Extrakte von *Herzkammern* wurden ähnlicherweise hergestellt. Es wurde gewöhnlich die untere Hälfte der Kammer mit 20 ccm Ringer

ausgezogen. *Der Kammerextrakt hat eine lähmende Wirkung auf den Darm.* Die Spontanbewegungen verschwinden für 10 bis 30 Sekunden, manchmal tritt auch eine starke Tonussenkung ein. Der Tonus erhöht sich nachher unter etwas verstärkten Bewegungen. Es verdient noch erwähnt zu werden, daß, wenn man die mit dem Kammerextrakt versetzte Lösung mit reiner Tyrodelösung verwechselt, eine kurzdauernde Kontraktur zu sehen ist.

Derartige Ausspülungswirkungen hat am Darme z. B. *Neukirch*[1]) nach Pilocarpinkontrakturen beobachtet. Interesssant ist beim Kammerextrakt der Umstand, daß die Ausspülkontraktur nach einer lähmenden Wirkung erfolgte. Das könnte darauf deuten, daß im Kammerextrakte neben dem lähmenden auch ein erregender Stoff wirksam ist.

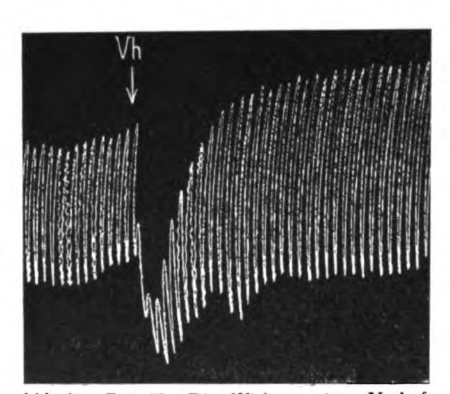


Abb. 10. Exp. 51. Die Wirkung eines Vorhofextraktes am Darm, das nach 1 h 25′ dauernder Durchspülung hergestellt wurde.

Wirkungsvolle Extrakte von der Kammer können auch ohne Verreiben erhalten werden. Liegen einige Stückchen Kammermuskel einige Minuten lang in Ringerlösung, so verleihen sie derselben auch so eine darmlähmende Eigenschaft. Extrakte anderer quergestreifter Muskel geben eine dem Kammerextrakt ganz ähnliche Wirkung. Wir haben daher hier nicht nur mit einer spezifischen Eigenschaft der Herzkammermuskulatur zu tun.

Beim *Schaf* und dem *Schwein* sind aus den muskulösen Vorhöfen Extrakte zu erhalten, die am Darm eine dem Herzkammerextrakt ähnliche lähmende Wirkung zeigen. Dadurch ist aber noch nicht erwiesen, daß in diesen keine erregende Stoffe vorkommen. Ihre Wirkung könnte auch durch die lähmende Substanz der stark entwickelten Muskulatur verdeckt werden. Bringt man ja einen erregend wirksamen Kaninchenvorhofextrakt mit ungefähr ebensoviel Kammerextrakt zusammen, so kann die Tonussteigerung ganz hintangehalten werden (vgl. Abb. 7d).

Zum Schluß sei mir gestattet, in erster Reihe Herrn Prof. *H. J. Hamburger* für die Aufnahme in das Institut und die wohlwollende Unterstützung, ebenso Herrn Dr. *R. Brinkman* meinen tiefsten Dank auszusprechen. Die vorliegende Arbeit wurde auf ihre Anregung begonnen; es wurde mir aber auch gestattet, das Thema über die ur-

[1]) *P. Neukirch*, Pflügers Arch. **147**, 153. 1912.

sprüngliche Fragestellung hinaus zu verfolgen. Auch Herrn Dr. *A. v. Szent-Györgyi* bin ich zu großen Dank verpflichtet, der mir bei der Ausführung der Experimente mit Rat und Tat in freundlicher Weise zu Hilfe war.

Zusammenfassung.

Es wird die Frage untersucht, ob auch beim Säugetier durch Reizung des Herzvagus Stoffe freikommen, die auf andere Organe vagusreizend wirken.

1. Werden die N. vagi des isolierten und nach *Langendorff* mit Ringer-Locke-Lösung durchströmten Kaninchenherzens einige Minuten gereizt und wird während dieser Zeit der Durchfluß abgeschlossen, so hat die nachher aufgefangene Durchspülungsflüssigkeit am überlebenden Dünndarm eine mehr oder minder stark erregende Wirkung. Das Freikommen dieser Reizstoffe muß zum Teil der Vagusreizung zugeschrieben werden.

2. Nach Abschluß der Durchströmung ohne Vagusreizung ist die Herzflüssigkeit am Darm unwirksam oder nur schwach wirksam.

3. Im Gegensatz zu einer im Beginn ausgeführten Abschließung erhält man nach einer zweiten Abschließung eine den Darm lähmende Flüssigkeit. Auch das Herz zeigt in seinem Verhalten bei der ersten und zweiten Abschließung Verschiedenheiten. Es zeigt sich hier also ein Parallelismus zwischen Herztätigkeit und Darmwirkung der Durchspülungsflüssigkeit. Es sind auch andere derartige Zusammenhänge zu finden.

4. Ein frisch bereiteter Extrakt des Kaninchenvorhofes ergibt am Dünndarm eine deutliche Erregung, manchmal starke Kontraktur. Der Kontraktur geht gewöhnlich eine kurzdauernde Lähmung voran. Die Erregung kann durch Atropin gehemmt werden.

5. War das Herz 1 bis 2 Stunden durchgespült, so reizt sein Vorhofextrakt den Darm nur schwach oder gar nicht. Die lähmende Wirkung tritt dann stärker zum Vorschein.

6. Vorhofextrakt vom Schaf, Schwein, Kammerextrakt vom Kaninchen haben, ebenso wie ein Skelettmuskelextrakt, eine lähmende Darmwirkung.

7. Die gefundenen Reizstoffe kommen, wenigstens zum Teil, frei infolge der Vagusreizung des Herzens, und machen es wahrscheinlich, *daß also auch beim Warmblüter eine humorale Übertragbarkeit von Nervenreizen besteht.*

Adsorption und Arzneimittelverteilung im Organismus. III.

Von

E. Keeser.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 1. Dezember 1923.)

I.

Der Vergleich des Adsorptionsvermögens verschiedener Kohlearten für Jod in vitro mit ihrem Entgiftungsvermögen bei Hunden gegenüber Strychnin[1]) ergab das bemerkenswerte Resultat, daß das Adsorptionsvermögen für Jod in vitro und das Entgiftungsvermögen der Kohlen keineswegs parallel gehen. Es ist deshalb nicht angängig, aus der Adsorptionsfähigkeit einer Kohle für Jod in vitro Schlüsse auf ihr Entgiftungsvermögen in vivo gegenüber Strychnin zu ziehen. Um die diesen Befunden zugrunde liegenden Verhältnisse zu klären, untersuchte Fräulein Dr. med. et phil. *H. Kaulla* im hiesigen Institut das Adsorptionsvermögen verschiedener Kohlearten für Morphinhydrochlorid und Strychninnitrat in vitro. Entsprechend den Versuchen *Joachimoglus* verwandten wir: Carbovent, Lindenkohle (*Kahlbaum*), Buchenholzkohle (*Kahlbaum*), Blutkohle, gepulvert (*Kahlbaum*). Blutkohle, gereinigt (*Kahlbaum*), Knochenkohle (*Kahlbaum*), Blutkohle (*Merck*), Buchenholzkohle (*Merck*).

Zur quantitativen Bestimmung der Alkaloide bedienten wir uns einer von *Kolthoff* ausgearbeiteten Methode, die dieser uns schriftlich mitteilte.

10 ccm einer m/1000 Morphinhydrochloridlösung werden mit 25 ccm n/10 $KMnO_4$-Lösung und 10 ccm verdünnter H_2SO_4 24 Stunden bei Zimmertemperatur im Erlenmeyer und mit einem Uhrglase bedeckt stehengelassen; es empfiehlt sich, erst nach Zusatz des Alkaloids anzusäuern. Dann setzt man 1 ccm einer 10proz. Kaliumjodidlösung zu, schüttelt um und bestimmt das durch das nicht für die Oxydation des Alkaloids verbrauchte $KMnO_4$ in Freiheit gesetzte Jod durch Titration mit n/10 Thiosulfatlösung.

10 ccm m/1000 Morphinhydrochloridlösung verbrauchen 5,8 bis 6,3 ccm n/10 $KMnO_4$, entsprechend den Ergebnissen von *Kolthoff*, der etwa 6,0 ccm n/10 $KMnO_4$ verbraucht.

Für unsere Adsorptionsversuche verwandten wir m/100 und m/50 Strychninnitrat sowie m/100 und m/50 Morphinhydrochlorid. 1 ccm der m/100 und 0,5 ccm der m/50 Lösungen verbrauchten 5,6

---

[1]) *Joachimoglu*, diese Zeitschr. **134**, 493, 1923.

bis 5,8 ccm n/10 $KMnO_4$. In dieser Verdünnung haben also äquimolare Lösungen der beiden Alkaloide fast gleichen O_2-Verbrauch. Die $KMnO_4$-Lösung wurde mit Oxalsäure eingestellt, letztere mit n/10 $NaOH$ kontrolliert. Die Thiosulfatlösung entspricht der Permanganatlösung.

Schüttelt man eine Lösung mit bekanntem Alkaloidgehalt, die mit einer der verschiedenen Kohlearten versetzt ist, 20 Minuten im Schüttelapparat, filtriert von der Kohle ab und läßt das klare, mit überschüssigem $KMnO_4$ und verdünnter H_2SO_4 versetzte Filtrat 24 Stunden stehen, so läßt sich durch die oben beschriebene Titration feststellen, wieviel von dem ursprünglich vorhandenen Alkaloid noch in der Lösung ist bzw. wieviel adsorbiert wurde.

Adsorption von Strychninnitrat.

Kohleart	30 ccm m/100 Strychninnitrat + 0,2 g Kohle Proz. adsorbiert	30 ccm m/100 Strychninnitrat + 0,5 g Kohle Proz. adsorbiert	30 ccm m/50 Strychninnitrat + 1 g Kohle Proz. adsorbiert
Carbovent	88,5	99,6	97,5
Lindenkohle *Kahlbaum*	40,1	46,9	48,9
Buchenholzkohle *Kahlbaum*	84,2	95,3	96,7
Blutkohle ger. *Kahlbaum*	82,7	95,6	97,1
„ gepulv., *Kahlbaum*	84,2	98,8	73,3
Buchenholzkohle *Merck*	44,1	48,9	61,3
Blutkohle *Merck*	87,4	98,2	99,5
Knochenkohle *Kahlbaum*	84,1	88,8	86,4

Adsorption von Morphinhydrochlorid.

Kohleart	30 ccm m/100 Morphinhydrochlorid + 0,5 g Kohle Proz. adsorbiert	30 ccm m/50 Morphinhydrochlorid + 1 g Kohle Proz. adsorbiert
Carbovent	90,7	93,8
Lindenkohle *Kahlbaum*	51,6	49,1
Buchenholzkohle *Kahlbaum*	90,65	90,5
Blutkohle, ger., *Kahlbaum*	73,4	80,0
„ gepulv., *Kahlbaum*	79,2	89,5
Buchenholzkohle *Merck*	51,6	52,5
Blutkohle *Merck*	79,5	86,9
Knochenkohle *Kahlbaum*	75,2	78,0

Vergleicht man die Stärke der prozentualen Adsorption der Alkaloide, so zeigt sich, daß das Strychninnitrat stärker als Morphinhydrochlorid adsorbiert wird; daraus ergibt sich, daß Strychninnitrat stärker oberflächenaktiv ist als Morphinhydrochlorid.

Wenn wir diese Befunde über die Adsorptionsfähigkeit der einzelnen Kohlearten mit den Ergebnissen ihres Entgiftungsvermögens im Tierexperiment sowie mit ihrem Bindungsvermögen für Jod in vitro vergleichen, so zeigen sich bemerkenswerte Unterschiede.

An Stelle	Im Tierversuch mit Strychnin	In vitro bei Adsorption von m/100 Morphin + 0,5 g Kohle	m/50 Morphin + 1 g Kohle	m/100 Strychnin + 0,2 g Kohle	m/100 Strychnin + 0,5 g Kohle	m/50 Strychnin + 1 g Kohle	Jod
1.	Knochenkohle *Kahlbaum*	Carbovent	Carbovent	Carbovent	Carbovent	Blutkohle *Merck*	Blutkohle, ger., *Kahlbaum*
2.	Blutkohle *Merck*	Buchenholzkohle *Kahlbaum*	Buchenholzkohle *Kahlbaum*	Blutkohle *Merck*	Blutkohle, ger., *Kahlbaum*	Carbovent	Carbovent
3.	Blutkohle, ger., *Kahlbaum*	Blutkohle, *Merck*	Blutkohle, ger., *Kahlbaum*	Blutkohle, ger., *Kahlbaum*	Blutkohle *Merck*	Blutkohle, ger., *Kahlbaum*	Blutkohle, *Merck*
4.	Buchenholzkohle. *Kahlbaum*	Blutkohle, ger., *Kahlbaum*	Blutkohle *Merck*	Buchenholzkohle *Kahlbaum*	Blutkohle, gep., *Kahlbaum*	Blutkohle, gep., *Kahlbaum*	Buchenholzkohle *Kahlbaum*
5.	(Carbo anim. pur.)	Knochenkohle, *Kahlbaum*	Blutkohle gep., *Kahlbaum*	Knochenkohle, *Kahlbaum*	Buchenholzkohle, *Kahlbaum*	Buchenholzkohle, *Kahlbaum*	(Carbo anim. pur.)
6.	Carbovent	Blutkohle gep., *Kahlbaum*	Knochenkohle *Merck*	Blutkohle gep., *Kahlbaum*	Knochenkohle *Kahlbaum*	Knochenkohle *Kahlbaum*	Knochenkohle *Kahlbaum*
7.	Lindenkohle *Kahlbaum*	Lindenkohle *Kahlbaum*	Buchenholzkohle *Merck*	Buchenholzkohle *Merck*	Buchenholzkohle *Merck*	Buchenholzkohle *Merck*	Lindenkohle *Kahlbaum*
8.	Buchenholzkohle *Merck*	Buchenholzkohle *Merck*	Lindenkohle *Kahlbaum*	Lindenkohle *Kahlbaum*	Lindenkohle *Kahlbaum*	Lindenkohle *Kahlbaum*	Buchenholzkohle *Merck*

Die Knochenkohle steht nur im Tierversuch an erster Stelle. Bei allen Versuchen in vitro gehört sie zwar zu den gut adsorbierenden Kohlearten, jedoch steht sie im allgemeinen hinter Carbovent, den beiden Blutkohlen *Kahlbaum*, der Blutkohle *Merck* und der Buchenholzkohle *Kahlbaum* zurück; durchweg schlecht adsorbieren Lindenkohle *Kahlbaum* und Buchenholzkohle *Merck*.

II.

Die Bedingungen für Knochenkohle müssen also im Magen-Darmkanal des Hundes besonders günstig sein. Wir vermuteten in der Alkalität des Magen-Darmkanals die Ursache für die stärkere Alkaloidadsorption durch Knochenkohle. Um in vitro den schwach alkalischen Bedingungen des Darmes zu entsprechen und so die Alkaloidbasen freizumachen, versuchten wir, die H-Ionenkonzentration und damit das Adsorptionsvermögen der Kohlen durch Zusatz von Pufferlösungen zu ändern. Glykokoll und Natriumcitrat reduzieren jedoch an sich schon $KMnO_4$ beträchtlich. Phosphatpuffer tun dies nicht, jedoch trat bei Zusatz von 10 ccm Natrium- bzw. 10 ccm Kaliumphosphat zu der mit Buchenholzkohle *Kahlbaum* versetzten Alka-

loidlösung keine nennenswerte Änderung in der Adsorption ein. Fügten wir jedoch $NaHCO_3$ (der Alkalität des Darmes entsprechend 0,25 : 100) zu den mit Kohle versetzten Alkaloidlösungen, so zeigte sich bei allen Kohlearten eine konstante Zunahme im Adsorptionsvermögen.

Kohleart	30 ccm m/100 Morphinhydrochlorid + 0,5 g Kohle	
	+ 0,075 g $NaHCO_3$ Proz. adsorbiert	ohne Zusatz von $NaHCO_3$ Proz. adsorbiert
Carbovent	99,3	90,7
Lindenkohle *Kahlbaum*	74,7	51,6
Buchenholzkohle *Kahlbaum*	94,0	90,65
Blutkohle, gepulv., *Kahlbaum*	98,7	73,4
" ger., *Kahlbaum*	99,6	79,2
Buchenholzkohle *Merck*	79,2	51,6
Blutkohle *Merck*	99,6	79,5
Knochenkohle *Kahlbaum*	93,7	75,2

Kohleart	30 ccm m/100 Strychninnitrat + 0,5 g Kohle	
	+ 0,075 g $NaHCO_3$ Proz. adsorbiert	ohne Zusatz von $NaHCO_3$ Proz. adsorbiert
Carbovent	100	99,6
Lindenkohle *Kahlbaum*	80,3	46,9
Buchenholzkohle *Kahlbaum*	93,6	95,3
Blutkohle, gepulv., *Kahlbaum*	99,6	95,6
" ger., *Kahlbaum*	100	98,8
Buchenholzkohle *Merck*	72,7	48,9
Blutkohle *Merck*	99,6	98,2
Knochenkohle *Kahlbaum*	96	88,8

Wurden 30 ccm m/50 Strychninnitrat mit 0,5 g Carbovent und 0,075 g $NaHCO_3$ angesetzt, so betrug die Alkaloidadsorption 70,8 Proz., ohne Zusatz von $NaHCO_3$ nur 65,4 Proz. Auch bei doppelter Alkaloidkonzentration wird also bei Bicarbonatzusatz mehr Alkaloid gebunden.

Vergleicht man diese Befunde mit den von *Joachimoglu* gefundenen Adsorptions- und Entgiftungswerten, so ergibt sich:

An Stelle	Im Tierversuch mit Strychninnitrat	In vitro unter Zusatz von $NaHCO_3$ bei Adsorption an 0,5 g Kohle		
		m/100 Morphinhydrochlorid	m/100 Strychninnitrat	Jodadsorption
1.	Knochenkohle *Kahlbaum*	Blutkohle, ger., *Kahlbaum*	Carbovent	Blutkohle, ger., *Kahlbaum*
2.	Blutkohle *Merck*	Blutkohle *Merck*	Blutkohle, ger., *Kahlbaum*	Carbovent
3.	Blutkohle, ger., *Kahlbaum*	Carbovent	Blutkohle *Merck*	Blutkohle *Merck*
4.	Buchenholzkohle *Kahlbaum*	Blutkohle, gep., *Kahlbaum*	Blutkohle, gep. *Kahlbaum*	Buchenholzkohle *Kahlbaum*
5.	(Carbo anim. pur.)	Knochenkohle *Kahlbaum*	Knochenkohle *Kahlbaum*	(Carbo anim. pur.)
6.	Carbovent	Buchenholzkohle *Kahlbaum*	Buchenholzkohle *Kahlbaum*	Knochenkohle *Kahlbaum*
7.	Lindenkohle *Kahlbaum*	Buchenholzkohle *Merck*	Lindenkohle *Kahlbaum*	Lindenkohle *Kahlbaum*
8.	Buchenholzkohle *Merck*	Lindenkohle *Kahlbaum*	Buchenholzkohle *Merck*	Buchenholzkohle *Merck*

In alkalischer Lösung finden wir bei den untersuchten Kohlen also auch keine genaue Analogie zwischen der Adsorptionsfähigkeit für Strychnin bzw. Morphin in vitro bzw. ihrem Entgiftungsvermögen gegenüber Strychnin in vivo. Die letztere Wirkung der Kohlen ist also nicht nur an die alkalische Reaktion gebunden, denn durch sie wird zwar quantitativ die Adsorptionsfähigkeit der Kohlen gesteigert, während gleichzeitig die individuellen Eigenschaften der Kohlen in qualitativ verschiedener Weise beeinflußt werden. Diese Veränderungen in der Adsorptionsfähigkeit zeigen sich nicht nur bei dem Vergleich ihrer Adsorptionskraft in vitro mit ihrem Entgiftungsvermögen in vivo, sondern auch bei dem ihrer Adsorptionsfähigkeit für Morphin mit und ohne Alkalizusatz in vitro.

Diese Unterschiede sowie der Umstand, daß bei Phosphatpufferung keine Änderung der Adsorptionsfähigkeit von Buchenholzkohle *Kahlbaum* gegenüber Morphin und Strychnin beobachtet wurde, führte uns dazu, gleiche Kohlenmengen mit gleichen Mengen m/500 HCl bzw. NaOH zu versetzen, 20 Minuten im Schüttelapparat zu schütteln und die p_H der Flüssigkeit nach 24 Stunden zu bestimmen. Hierbei fiel auf, daß sich die Kohlesuspensionen im Sauren schnell und vollständig absetzten, während sie im Alkalischen sehr stabil waren, so daß sich die Kohlen selbst nach 24 Stunden noch nicht völlig am Boden des Gefäßes abgesetzt hatten. Diese Erscheinung ist ein Ausdruck ihrer negativen Ladung, infolge deren die sich gegenseitig abstoßenden Kohlepartikeln im alkalischen Milieu in Suspension bleiben, während sie in saurer Lösung teilweise oder ganz entladen werden, zusammensintern und zu Boden sinken.

1. 0,3 g Kohle + 100 ccm m/500 HCl ($p_H = 2,8$). p_H der Flüssigkeit nach 24 Stunden bei Zusatz von:

Buchenholzkohle *Kahlbaum*	6,2
Lindenkohle *Kahlbaum*	3,0
Carbovent	3,0
Knochenkohle *Kahlbaum*	3,1
Blutkohle, gereinigt, *Kahlbaum*	3,1
Blutkohle *Merck*	3,1

Sämtliche Kohlearten adsorbieren H˙-Ionen aus der Lösung, am stärksten Buchenholzkohle *Kahlbaum*.

2. 0,3 g Kohle + 100 ccm m/500 NaOH ($p_H = 11$). p_H der Flüssigkeit nach 24 Stunden bei Zusatz von:

Buchenholzkohle *Kahlbaum*	8,0
Lindenkohle *Kahlbaum*	7,5
Knochenkohle *Kahlbaum*	7,2
Carbovent	7,5
Blutkohle, gereinigt, *Kahlbaum*	7,2
Blutkohle *Merck*	7,5

Sämtliche Kohlearten binden also OH′-Ionen.

Aus diesen Versuchen muß geschlossen werden, daß die Kohlen imstande sind, sowohl Anionen wie Kationen zu binden, daß jedoch auf Grund der besonderen Eigenart ihrer Zusammensetzung ihre Adsorptionsfähigkeit für die verschiedenen Ionenarten verschieden groß ist, und daß der Reichtum der Kohlen an Anionen größer ist als der an Kationen, da sie sich in aqua dest. negativ elektrisch verhalten. Aus dem komplizierten Aufbau dessen, was wir als „Kohle" bezeichnen — verschieden in der Art der Herkunft und der Verarbeitung —, erklären sich die Unterschiede der Adsorptionsfähigkeit in vitro den verschiedenen Substanzen gegenüber, die verschiedenartige Steigerung ihrer Adsorptionskraft bei Zusatz von $NaHCO_3$ sowie das verschiedenartige Verhalten im Darm, wo sie in einer Flüssigkeit suspendiert sind, in der die verschiedensten Ionenarten auf sie einwirken. Die oben geschilderten Versuche bilden also eine Bestätigung der Angaben *Joachimoglus*, „daß wir die Befunde in vitro für das Verhalten im Organismus, hier im Magen-Darmkanal des Hundes, nur mit Vorsicht verwenden können".

III.

Die oben geschilderten Befunde führten dazu, den isoelektrischen Punkt der verschiedenen Kohlen zu bestimmen. Diese Versuche wurden mit Hilfe der Elektroendosmose ausgeführt, wozu ich die von *Gyemant*[1]) angegebene Apparatur verwendete. In einem Becherglase wurde die zu untersuchende Kohle mit der Flüssigkeit, mit der auch der äußere Zylinder der Apparatur gefüllt war, angerührt und dann in den inneren Zylinder gegossen. Darauf wurde dieser mit einem dreifach durchbohrten Gummistopfen geschlossen, durch den das Steigrohr, die KCl-Agarröhre sowie ein mit einem Hahn abschließbares Überlaufrohr führten. Im Verlauf der einzelnen Versuche wurde die p_H in der Außenflüssigkeit zu Beginn sowie am Ende, in der Innenflüssigkeit nur am Ende des Versuches bestimmt, soweit sie mit der Indikatorenmethode[2]) meßbar war. Bei Versuchen, in denen nicht das elektrische Verhalten, sondern nur die p_H der Innen- und Außenlösung festgestellt wurde, zeigte sich nämlich, daß die Innen-p_H sich sofort beim Ansetzen des Versuchs einstellt und während der Dauer eines Versuchs sich nicht mehr ändert.

Beispiel: m/2000 HCl, $p_H = 3,2$. Nach Ansetzen des Versuchs mit Knochenkohle *Kahlbaum*:

	Außen $p_H = 3,2$,	innen $p_H = 5,0$,
nach 2 Stunden	„ $p_H = 3,3$,	„ $p_H = 5,0$,
„ 24 „	„ $p_H = 3,6$,	„ $p_H = 5,0$,
„ 48 „	„ $p_H = 3,8$,	„ $p_H = 5,0$.

[1]) *Gyemant*, Kolloid-Zeitschr. 28, 103, 1921.
[2]) *L. Michaelis* und *A. Gyemant*, diese Zeitschr. 109, 165, 1920.

Der gleiche Versuch ergab, mit Buchenholzkohle *Kahlbaum* angesetzt

Nach 5 Minuten außen $p_H = 3,2$, innen $p_H = 6,7$,
„ 2 Stunden „ $p_H = 3,4$, „ $p_H = 6,7$,
„ 24 „ „ $p_H = 3,7$, „ $p_H = 6,7$.

Die elektroendosmotischen Versuche ergaben folgendes:

1. Lindenkohle *Kahlbaum*.

	p_H			Ladung der Kohle
	zu Beginn des Versuchs	am Ende des Versuchs		
		in der Außenflüssigkeit	in der Innenflüssigkeit	
m/1000 NaOH . . .	7,7	7,4	6,8	negativ
Leitungswasser . . .	7,2	7,1	6,8	„
Aqua dest.	6,1	5,9	6,7	„
m/500 HCl	2,8	< 2,8	4,1	„
m/167 HCl	—	—	< 2,8	„

Die Kohle wird innerhalb der untersuchten Breite nicht umgeladen.

Bei Lindenkohle *Kahlbaum* sowie bei den anderen untersuchten Kohlen nimmt die Wanderungsgeschwindigkeit der Flüssigkeit im Steigrohr mit zunehmender ($H^{\cdot}$) ab.

2. Tierblutkohle *Merck*.

	p_H			Ladung der Kohle
	zu Beginn des Versuchs	am Ende des Versuchs		
		in der Außenflüssigkeit	in der Innenflüssigkeit	
m/500 NaOH . . .	8,4	8,2	6,8	negativ
Leitungswasser . . .	7,2	6,9	6,7	„
Aqua dest.	6,0	5,9	6,4	„
m/500 H_2SO_4 . . .	2,8	3,0	6,0	„
m/350 „ . . .	< 2,8	< 2,8	4,2	„
m/333 „ . . .	< 2,8	< 2,8	4,0	positiv
m/250 HCl	—	—	3,0	„

Die Kohle wird umgeladen bei $p_H = 4,0$.

3. Blutkohle, gereinigt, *Kahlbaum*.

	p_H			Ladung der Kohle
	zu Beginn des Versuchs	am Ende des Versuchs		
		in der Außenflüssigkeit	in der Innenflüssigkeit	
Aqua dest.	6,0	5,7	6,2	negativ
m/500 H_2SO_4 . . .	2,8	3,1	4,2	„
m/350 „ . . .	—	—	3,8	„
m/500 HCl	—	—	3,6	„
m/333 „	—	—	3,5	positiv
m/100 „	—	—	< 2,8	„

Die Kohle wird umgeladen bei $p_H = 3,5$ (nach *Gyemant* bei $p_H = 3,43$).

4. Buchenholzkohle *Kahlbaum*.

	p_H			Ladung der Kohle
	zu Beginn des Versuchs	am Ende des Versuchs in der Außenflüssigkeit	am Ende des Versuchs in der Innenflüssigkeit	
m/500 NaOH	8,4	8,1	7,7	negativ
Leitungswasser . . .	7,2	7,0	6,8	„
Aqua dest.	6,2	6,0	6,7	„
m/500 HCl	—	3,0	6,6	positiv
m/250 H_2SO_4 . . .	—	2,8	6,6	„
m/250 HCl	—	—	6,5	„

Die Kohle wird umgeladen bei $p_H = 6,6$.

5. Buchenholzkohle *Merck*.

	p_H			Ladung der Kohle
	zu Beginn des Versuchs	am Ende des Versuchs in der Außenflüssigkeit	am Ende des Versuchs in der Innenflüssigkeit	
m/1000 NaOH . . .	7,7	7,2	6,4	negativ
m/2500 „ . . .	6,6	6,5	6,4	„
m/500 HCl	2,8	2,8	5,3	„
m/333 „	—	—	2,9	„
m/250 „	—	—	2,8	„

Die Kohle wird innerhalb der untersuchten Breite nicht umgeladen.

6. Carbovent.

	p_H			Ladung der Kohle
	zu Beginn des Versuchs	am Ende des Versuchs in der Außenflüssigkeit	am Ende des Versuchs in der Innenflüssigkeit	
m/500 NaOH . . .	8,4	8,4	7,4	negativ
m/20000 HCl	4,8	4,7	5,3	„
m/2000 H_2SO_4 . . .	3,5	3,8	4,0	„
m/500 „ . . .	2,8	3,2	3,9	positiv
m/250 „ . . .	—	2,8	3,6	„
m/200 „ . . .	—	—	3,4	„

Die Kohle wird umgeladen bei $p_H = 3,9$.

7. Knochenkohle *Kahlbaum*.

	p_H			Ladung der Kohle
	zu Beginn des Versuchs	am Ende des Versuchs in der Außenflüssigkeit	am Ende des Versuchs in der Innenflüssigkeit	
Aqua dest.	6,0	5,6	5,4	negativ
m/10000 HCl	3,6	4,8	5,4	„
m/500 „	2,8	2,9	4,7	„
m/250 „	—	—	4,1	„
m/167 „	—	—	2,8	„

Die Kohle wird innerhalb der untersuchten Breite nicht umgeladen.

Die Versuche zeigen, daß ein prinzipieller Unterschied zwischen den einzelnen Kohlen als Ausdruck ihrer Herkunft nicht besteht, sondern daß ihr verschiedenes Verhalten durch die Art ihrer Verarbeitung wesentlich mitbedingt ist. So ist die Buchenholzkohle *Kahlbaum* umladbar, während es die Buchenholzkohle *Merck* innerhalb der untersuchten Breite nicht ist.

Zusammenfassung.

1. Die vorstehenden Untersuchungen haben ergeben, daß eine Parallelität zwischen der Adsorptionsfähigkeit einer Kohle für Alkaloide und der für Jod in vitro sowie ihrem Entgiftungsvermögen im Magen-Darmkanal des Hundes nicht besteht.

2. Infolgedessen kann aus der Prüfung der Adsorptionsfähigkeit einer Kohle in vitro ein sicherer Schluß auf ihr Entgiftungsvermögen im Magen-Darmkanal nicht gezogen werden. Dieser Befund bildet eine Bestätigung der Ergebnisse, zu denen *Joachimoglu* auf Grund seiner Untersuchungen über die Beziehungen zwischen dem Adsorptions- und Entgiftungsvermögen der Kohlen gelangte.

3. Ein prinzipieller Unterschied zwischen den einzelnen Kohlen als Ausdruck ihrer Herkunft besteht nicht, sondern ihr verschiedenartiges Verhalten wird durch die Art ihrer Verarbeitung wesentlich mitbedingt.

4. Buchenholzkohle *Merck* und Lindenholzkohle *Kahlbaum* adsorbieren unter allen angestellten Versuchsbedingungen schlecht; Blutkohle *Merck*, gereinigte und gepulverte Blutkohle *Kahlbaum*, Knochenkohle *Kahlbaum*, Buchenholzkohle *Kahlbaum* sowie Carbovent besitzen eine gute Adsorptionsfähigkeit.

5. Strychninnitrat wird stärker adsorbiert als Morphinhydrochlorid.

6. Durch Zusatz von Natriumbicarbonat wird die Adsorption von Morphinhydrochlorid und Strychninnitrat an Kohle verstärkt.

7. Tierblutkohle *Merck* wird bei $p_H = 4{,}0$, gereinigte Blutkohle *Kahlbaum* bei $p_H = 3{,}5$, Buchenholzkohle *Kahlbaum* bei $p_H = 6{,}6$, Carbovent bei $p_H = 3{,}9$ umgeladen; Knochenkohle *Kahlbaum*, Buchenholzkohle *Merck* und Lindenkohle *Kahlbaum* werden innerhalb der untersuchten Breite nicht umgeladen.

Über die Ernährung von Pflanzen mit Aldehyden. II.

Von

Th. Sabalitschka.

Polymerisation des Formaldehyds durch Phaseolus multiflorus und Pelargonium zu höheren Kohlehydraten[1].

Von

Th. Sabalitschka und **H. Riesenberg.**

(Aus dem pharmazeutischen Institut der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 5. Dezember 1923.)

Nach der Assimilationshypothese von *v. Baeyer* ist Formaldehyd ein Zwischenprodukt bei der Umwandlung der Kohlensäure zu Zucker und Stärke im Pflanzenkörper. Dies regte zur Prüfung der Frage an, ob die Pflanzen Formaldehyd als Nährstoff verwenden können.

Versuche in dieser Richtung führten aus: *O. Treboux*[2]), *Th. Bokorny*[3]), *V. Grafe* und *E. Vieser*[4]), *S. M. Baker*[5]), *M. Jacoby*[6]), *Th. Sabalitschka*[7]) und *E.* und *G. Nicolas*[8]). Diese Forscher boten verschiedenen Pflanzen Formaldehyd als Nährstoff und beobachteten, ob dadurch der Gehalt der Pflanzen an Trockensubstanz oder der Zucker- und Stärkegehalt eine Erhöhung erfährt. Soweit die Versuche im Lichte ausgeführt wurden, sprachen ihnen *R. Willstätter* und *A. Stoll*[9]) eine Bedeutung für die Prüfung

---

[1]) I. Mitteilung Ber. d. deutsch. pharm. Ges. **32**, 278, 1922.

[2]) Flora **92**, 49, 1903.

[3]) Ber. d. deutsch. bot. Ges. **9**, 103, 1891; Ref. Chem.-Ztg. Rept. 1891, S. 167; Pflügers Arch. f. Physiol. **125**, 467, 1908; **128**, 565, 1909; diese Zeitschr. **36**, 83, 1911; Landw. Jahrb. **21**, 445, 1892; Chem.-Ztg. **27**, 525, 1903.

[4]) Ber. d. deutsch. bot. Ges. **27**, 431, 1909; **29**, 19, 1911; diese Zeitschr. **32**, 114, 1911.

[5]) Ann. of Botany **27**, 411, 1913.

[6]) Diese Zeitschr. **101**, 1, 1920; **128**, 119, 1922.

[7]) Ber. d. deutsch. pharm. Ges. **32**, 278, 1922; Zeitschr. f. angew. Chem. **35**, 684, 1922; Pharm. Monatshefte **4**, 169, 1923.

[8]) C. r. **175**, 836, 1437, 1922; **176**, 404, 1923; C. r. soc. de biol. **87**, 1315, 1922; Ref. Chem. Centralbl. **1923**, III., S. 1030, 1284; Bot. Centralbl. **2**, 360; **3**, 42.

[9]) *R. Willstätter* und *A. Stoll*, Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure, S. 164. Berlin 1918.

der Verwertbarkeit des Formaldehyds durch die Pflanzen ab; es erscheint nämlich möglich, daß der von außen der Pflanze gebotene Formaldehyd durch Oxydation von der Pflanze entgiftet und die entstehende Säure photosynthetisch assimiliert wird. Im Dunkeln bot einerseits *Jacoby*, andererseits *Sabalitschka* den Pflanzen Formaldehyd; ersterer stellte dabei eine Erhöhung des Trockengewichtes, letzterer eine Vermehrung höherer Kohlehydrate, wahrscheinlich von Zucker und Stärke, fest.

Sabalitschka benutzte zu seinen Versuchen die Kapuzinerkresse, Tropaeolum majus L., und die Wasserpest, Elodea canadensis R. und M.; wir stellten Versuche mit der Bohne, Phaseolus multiflorus Wld. an. Verwendet wurde die schon von *Sabalitschka* an anderer Stelle[1]) eingehend beschriebene Apparatur, welche gestattet, den blatttragenden Teilen der Pflanzen unter Abschluß von Kohlensäure Formaldehyd in der Atmosphäre zuzuführen, ohne daß sich die Wurzeln in der Formaldehydatmosphäre befinden.

Die oberirdischen Teile von zwei Pflanzen wurden in getrennte, abgeschlossene Räume gebracht und den Pflanzen dort unter täglicher Erneuerung der Luft die Kohlensäure entzogen. Nachdem die Pflanzen mehrere Tage der Kohlensäure entbehrt, also gehungert hatten, bot man der einen Pflanze in der Atmosphäre geringe Mengen von Formaldehyd, der anderen Pflanze stand auch weiterhin weder Kohlensäure noch Formaldehyd zur Verfügung. Zugleich wurde nunmehr vollkommen verdunkelt. Wir erneuerten mehrere Tage lang täglich die Luft in den abgeschlossenen Räumen, in welchen sich die oberirdischen Teile der Pflanzen befanden. Der Formaldehydgehalt der die Pflanzen umgebenden Atmosphäre wurde stets möglichst gleichmäßig gehalten. Dies erreichten wir durch Einbringen einer genügenden Menge Formaldehydlösung in den Raum, da sich so der Raum mit Formaldehyddämpfen entsprechend dem Partialdruck der Lösung sättigte und die von den Pflanzen weggenommenen Formaldehydmengen sich wieder von selbst ergänzten. Nach den Untersuchungen von *F. Auerbach* und *H. Barschall*[2]) gibt eine Lösung von 8 g Formaldehyd in 100 ccm Wasser nur 0,28 g Formaldehyd an 1 cbm Luft ab. Verwendet man eine genügende Menge der Formaldehydlösung, so erfährt ihre Konzentration durch die Formaldehydabgabe an die überstehende Luft, wie auch infolge Entfernung des Formaldehyds durch die Pflanze keine erhebliche Veränderung während des Versuchs. Der Luftstrom, welcher zur Erneuerung der Luft täglich durch den abgeschlossenen Raum geleitet wurde, hatte vor dem Eintritt in den Raum eine Formaldehydlösung zu passieren, deren Konzentration das Zweifache der im Raume selbst sich befindenden Formaldehydlösung betrug. So kam der Formaldehydgehalt des Luftstromes beim Eintritt in den Raum mindestens dem der dort vorhandenen Luft gleich.

Nach mehreren Tagen entnahmen wir die Pflanzen der Apparatur, trennten sofort scharf die Blattspreiten von den Blattstielen und bestimmten ihre Frischgewichte und ihre Flächen. Zur Ermittlung der Fläche breiteten wir die Blattspreiten auf einem kartonstarken, lichtempfindlichen Papier aus, beschwerten sie wenig mit Glasstreifen und setzten sie so lange dem

---

[1]) Ber. d. deutsch. pharm. Ges. **32**, 290, 1922.

[2]) Arbeiten aus dem kaiserl. Gesundheitsamt **22**, 626, 1905.

Lichte aus, bis sich ihre Umrisse auf dem Papier deutlich abhoben. Das Papier erhielten wir, indem wir eine Lösung von 8 g Kaliumferricyanid in 50 g Wasser mit einer filtrierten Lösung von 10 g Ferriammoniumcitrat in 50 g Wasser mischten und im Dunkeln das Gemisch auf das Papier aufstrichen; dieses wurde sodann im Dunkeln getrocknet und aufbewahrt. Die im Bilde festgehaltenen Blattflächen schnitt man nachträglich aus und berechnete die Flächen aus dem Gewicht der Ausschnitte und dem Gewicht eines Stückes des gleichen Papieres von bekannter Fläche.

Nachdem die Blattflächen sich auf dem Papier abgezeichnet hatten, wurden sie sofort getrocknet, zu einem feinen Pulver zerrieben und sodann bis zum konstanten Gewicht weiter getrocknet. Das vollkommen trockene Blattpulver zogen wir mit 25 ccm Wasser in einem verschlossenen Gefäß unter häufigem Umschütteln 24 Stunden bei Zimmertemperatur aus. Das wässerige Extrakt wurde abgesaugt, Gefäß und Filterrückstand mit 5 ccm Wasser nachgewaschen und der wässerige, mit dem Waschwasser vereinte Auszug nochmals filtriert. Das Filtrat dampften wir auf dem Wasserbade ein, trockneten den Rückstand bei 100° bis zum konstanten Gewicht und ermittelten sein Gewicht. Das Blattpulver wurde auf dem Saugfilter noch feucht mit Alkohol übergossen und mehrmals mit Wasser ausgewaschen, damit es sich nach dem Trocknen leicht vom Filter abnehmen ließ. Der Extraktrückstand diente zur Bestimmung des Zuckers, das auf dem Filter verbliebene Blattpulver zur Bestimmung der Stärke.

Zur Bestimmung des Zuckers wurde der Extraktrückstand in Wasser gelöst, etwa vorhandener, nicht direkt reduzierender Zucker durch Kochen mit verdünnter Salzsäure hydrolysiert und nach der Neutralisation der Gehalt der Lösung an reduzierendem Zucker nach *Meissl-Allihn* ermittelt. Die in dem mit Alkohol ausgewaschenen Blattpulver vorhandene Stärke führten wir durch dreistündiges Kochen mit Salzsäure in Dextrose über, trennten das nicht Gelöste von der Dextroselösung durch Filtration und bestimmten im Filtrat nach der Neutralisation den Gehalt an Dextrose nach *Meissl-Allihn*. Aus den gefundenen Dextrosewerten wurde der Stärkegehalt berechnet. Bei allen Versuchen benutzten wir zu dieser Untersuchung dieselben Mengenverhältnisse und verfuhren auch sonst vollkommen gleichmäßig.

Bei der Umformung des Formaldehyds im Pflanzenkörper entstehen wohl höhere Polymerisationsprodukte desselben. Die von Natur aus in den Pflanzen vorhandenen höheren Polymerisationsprodukte des Formaldehyds sind teils wasserlöslich, so die Zuckerarten, teils in Wasser unlöslich, so die Stärke. Daher wurde bei unseren Untersuchungen die Bestimmung der wasserlöslichen Polymeren wie eine Zuckerbestimmung, die Bestimmung der in Wasser nicht löslichen Polymeren wie eine Stärkebestimmung durchgeführt und der dabei erhaltene Wert auf Glucose einerseits, auf Stärke andererseits berechnet. Ob die so gefundenen Werte in der Tat auch ausschließlich der Glucose und der Stärke entsprechen, darüber wollen wir noch nicht entscheiden. Daß aber diese Erhöhung des Zucker- und Stärkegehaltes nicht einfach durch Formaldehyd selbst oder ein einfaches Polymeres desselben, das beim Kochen mit Wasser wieder Formaldehyd abspalten kann, vorgetäuscht wird, zeigten besondere von uns in dieser Richtung ausgeführte Versuche, über die wir anschließend berichten.

Wir gaben in den Raum, in welchem sich der blatttragende Teil der Pflanze befand, eine 1-, 2- und 4proz. Formaldehydlösung. Wie

schon oben erläutert, passierte der Luftstrom vor dem Eintritt in den Raum eine Formaldehydlösung von der zweifachen Konzentration der Lösung im Raume. Bei der stärksten hier benutzten Konzentration trat bereits eine erhebliche Schädigung der Pflanzen ein. Die Giftwirkung des Formaldehyds äußerte sich in einem starken Schrumpfen der Blätter; war dieses auch schon bei der 2proz. Formaldehydlösung zu beobachten, so ging es bei der 4proz. Lösung so weit, daß die Blätter infolge des starken Schrumpfens direkt einrissen. Dies steht im Einklang mit der Feststellung von *R. Willstätter* und *A. Stoll*[1]), daß Luft nach dem Passieren einer 8proz. Formaldehydlösung Blätter stark schädigt. Auch hier behielten die Blätter der Formaldehydpflanzen durchweg weit besser ihre grüne Farbe als die Vergleichspflanzen, was bereits *Jacoby*[2]) und *Sabalitschka*[3]) beobachteten. Die Bohne eignet sich zu den Versuchen weniger als die Kapuzinerkresse, da sie dabei leicht teilweise die Blätter abwirft, und zwar nicht nur die Formaldehydpflanze, sondern auch die Vergleichspflanze. Das ist wohl auf den Mangel der Kohlensäureassimilation und den daraus sich ergebenden Hungerzustand der Pflanzen zurückzuführen. Zur Herstellung der Formaldehydlösungen diente reines Paraform.

Für je 100 qcm Blattflächen fanden wir:

	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3		Versuch 4	
	CH_2O-Konzentration							
	1 proz.		2 proz.		2 proz.		4 proz.	
	mit	ohne	mit	ohne	mit	ohne	mit	ohne
	Formaldehyd							
Trockensubstanz . g	0,16	0,13	0,22	0,20	0,17	0,13	0,16	0,16
Zucker . . . . . mg	28	8	22	4	32	26	29	26
Stärke . . . . . „	17	5	11	3	12	9	11	8

Für je 100 g frische Blätter fanden wir:

Trockensubstanz . g	10,5	9,2	10,8	8,5	9,6	7,4	9,6	9,4
Zucker . . . . . mg	1250	330	1400	260	1850	1520	1750	1500
Stärke . . . . . „	780	220	710	200	700	570	680	450

Durch den Formaldehyd wurde somit der Zucker- und Stärkegehalt der etiolierten Pflanzen stets erhöht. Versuche 1 und 2 wurden mit jüngeren, Versuche 3 und 4 mit älteren Pflanzen ausgeführt. Darauf ist wohl der verschiedene Gehalt der Vergleichspflanzen an Zucker und Stärke zwischen Versuch 1 und 2 einerseits und Versuch 3 und 4 andererseits zurückzuführen. Bemerkenswert ist noch das Verhältnis des

[1]) *R. Willstätter* und *A. Stoll*, Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure, S. 165. Berlin 1918.

[2]) Diese Zeitschr. **101**, 1, 1920; **128**, 119, 1922.

[3]) Ber. d. deutsch. pharm. Ges. **32**, 298, 1922.

Zuckergehaltes zum Stärkegehalt. Letzterer war durchweg geringer als der erstere, während z. B. bei der von *Th. Sabalitschka* zu seinen Versuchen benutzten Kapuzinerkresse das Verhältnis gerade umgekehrt war. Auf den hohen Zuckergehalt der Bohne wies schon *Grafe*[1]) hin. Dieser Forscher wurde durch seine Beobachtungen zu der Ansicht geführt, daß Formaldehyd von der Bohne, Phaseolus vulgaris, nur in Zucker, nicht aber in Stärke umgewandelt würde.

Fast durchweg ergab die Darreichung von Formaldehyd auch eine Erhöhung des Trockengewichtes, und zwar nicht nur bei Berechnung auf gleiche Blattfrischgewichte, sondern auch auf gleiche Blattflächen; es kann also die Erhöhung des prozentualen Trockengewichtes nicht einfach durch eine Herabsetzung des Wassergehaltes der Blätter unter der Einwirkung des Formaldehyds erklärt werden. Nur bei Versuch 4, wo die hohe Formaldehydkonzentration bereits eine erhebliche Schädigung der Pflanze verursachte, bestand die Erhöhung des Trockengewichtes bei Berechnung auf gleiche Blattflächen nicht mehr, bei Berechnung auf gleiche Blattfrischgewichte war sie unwesentlich. Daß Formaldehyd das Trockengewicht der Pflanzen auch im Dunkeln erhöht, hat zuerst *Jacoby*[2]), dann *Th. Sabalitschka*[3]) beobachtet. Diese Beobachtungen haben sich hier bestätigt.

Wenn wir Zweige von Pelargonium im Dunkeln direkt in eine Lösung von Formaldehyd eintauchen ließen, konnten wir ebenfalls eine Erhöhung der Kohlehydrate in den Blättern beobachten. Allerdings zeigten sich hierbei erheblichere Schädigungen der Pflanzen, als wenn man ihnen den Formaldehyd in der Atmosphäre bot. Zweige von Pelargonium stellten wir in Wasser und bewahrten sie 2 Tage unter einer Glasglocke, unter welcher sich auch Calciumoxyd befand, auf. Nachdem die Pflanzen so 2 Tage der Kohlensäure entbehrt, also gehungert hatten, stellte man sie in Formaldehydlösungen verschiedener Konzentration, und zwar im Dunkeln, eine Vergleichspflanze in reines Wasser. Nach 1½ Tagen zeigten die Pflanzen je nach der Konzentration der Lösungen, in welche sie eintauchten, verschieden starke Schädigungen. Nach 2½ Tagen wurde in derselben Weise wie oben ihr Gehalt an Trockensubstanz, Zucker und Stärke bestimmt.

Für je 100 qcm Blattflächen fanden wir:

	Bei einer CH_2O-Konzentration von Proz.					
	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05
Trockensubstanz . . . g	0,25	0,28	0,36	0,31	0,25	0,27
Zucker . . . . . . mg	4,6	6,2	6,5	5,3	5,3	3,4
Stärke . . . . „	7,1	11,7	13,8	11,2	15,1	10,3

[1]) Ber. d. deutsch. bot. Ges. **29**, 24, 1911.
[2]) Diese Zeitschr. **101**, 1, 1920; **128**, 119, 1922.
[3]) Ber. d. deutsch. pharm. Ges. **32**, 297, 1922.

Für je 100 g frische Blätter fanden wir:

	Bei einer CH_2O-Konzentration von Proz.					
	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05
Trockensubstanz . . . g	5,0	5,6	7,0	7,3	5,4	6,7
Zucker . . . . . . mg	103	124	127	123	113	83
Stärke . . . . „	154	233	268	261	322	252

Der Gehalt der Blätter an Zucker und Stärke steigt zuerst mit der Konzentration des Formaldehyds an, um dann wieder zu fallen. Bei der Pflanze in der 0,05proz. Lösung übte der Formaldehyd bereits eine starke Giftwirkung aus. Das Abfallen der gefundenen Zucker- und Stärkemengen bei den höheren Konzentrationen spricht gegen das an sich berechtigte Bedenken, daß die hier gefundenen Zucker- und Stärkemengen teilweise durch Formaldehyd oder Paraform dargestellt werden. Übrigens hat bereits *H. Fincke*[1]) bei Rhabarberblättern festgestellt, daß sich in den Blattflächen kein Formaldehyd nachweisen läßt, wenn auch die Stiele der Blätter 2 Tage in eine Formaldehydlösung 1 : 3300 eintauchten. *Fincke* führt dies auf eine Zerstörung des Formaldehyds durch die Pflanzensubstanz zurück. Die Trockensubstanz wurde auch hier durch Formaldehyd erhöht, abgesehen von den stärkeren Konzentrationen, wo die Giftwirkung schon äußerlich auffallend in die Erscheinung trat.

Aus diesen Versuchen ergibt sich die Fähigkeit der Pflanzen, Formaldehyd zum Aufbau höherer Polymerisationsprodukte zu benutzen, und zwar im Dunkeln; dies steht im Einklang mit der *Baeyer*schen Assimilationstheorie, kann aber nicht als ein direkter Beweis für deren Richtigkeit gelten. Es kann die Ausnutzung des Formaldehyds auch auf einer Fähigkeit der Pflanzen beruhen, sich in ihrer Ernährung den zur Verfügung stehenden Stoffen anzupassen. So erscheint eine Ausnutzung des Formaldehyds immerhin möglich, auch wenn er nicht bei der normalen pflanzlichen Kohlenstoffassimilation entsteht.

[1]) Diese Zeitschr. 52, 214. 1913.

Über die Ernährung von Pflanzen mit Aldehyden. III.

Von

Th. Sabalitschka.

Stört noch vorhandener Formaldehyd die Bestimmung von Zucker und Stärke nach Sabalitschka in den mit Formaldehyd behandelten Pflanzen?

Von

Th. Sabalitschka und H. Riesenberg.

(Aus dem pharmazeutischen Institut der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 5. Dezember 1923.)

Bei Untersuchungen über die Fähigkeit der Pflanze, Formaldehyd zum Aufbau höherer Kohlehydrate zu verwenden, bedienten wir[1]) uns zur Ermittlung des Gehaltes der mit Formaldehyd behandelten Pflanzen an höheren Kohlehydraten der Bestimmung von Zucker und von Stärke nach *Meissl-Allihn*. Es war aus verschiedenen Gründen nicht wahrscheinlich, daß die bei jenen Versuchen gefundene Vermehrung des Zucker- und Stärkegehaltes durch Formaldehyd vielleicht durch von der Pflanzensubstanz zurückgehaltenen Formaldehyd vorgetäuscht sei. Schon die Behandlung des Untersuchungsmaterials vor der Zucker- und Stärkebestimmung sprach gegen eine Störung dieser Bestimmungen durch Formaldehyd. Weiterhin hätte eine derartige Formaldehydmenge, wie sie der gefundenen Erhöhung des Zuckers und der Stärke unter Berücksichtigung des bei der Vorbehandlung des Pflanzenmaterials entstandenen Verlustes an Formaldehyd entsprechen würde, bei den Pflanzen selbst eine viel erheblichere Giftwirkung auslösen müssen, als tatsächlich zu beobachten war. Dies ergibt sich aus den Versuchen von *Bokorny*[2]). Trotzdem schien es

[1]) *Th. Sabalitschka*, Ber. d. deutsch. pharm. Ges. **32**, 278, 1922; *Th. Sabalitschka* und *Riesenberg*, vorstehende Mitteilung.

[2]) Diese Zeitschr. **36**, 83, 1911.

uns zweckmäßig, die Frage zu prüfen, ob und wieweit vielleicht unsere früheren Versuchsergebnisse durch Formaldehyd störend beeinflußt waren.

Wir bedurften dazu einer Methode, sehr geringe Mengen von Formaldehyd zu erkennen und annähernd quantitativ zu bestimmen. Der Formaldehyd sollte durch Destillation von den anderen organischen Substanzen vor der Ausführung der Reaktion getrennt werden. Der nach dem früher beschriebenen Gang der Untersuchung erhaltene Trockenrückstand der wässerigen Blattauszüge wurde in 5 ccm Wasser gelöst, die Lösung in einen 10-ccm-Kolben gegeben und dieser mit einem Korken verschlossen, dem ein zweimal rechtwinkelig gebogenes Glasrohr (10 . 10 . 10 cm) aufgesetzt war. Man destillierte von der Lösung 4 ccm über, und zwar innerhalb 15 Minuten, wobei man das Destillat durch ein um den wagerechten Teil des Glasrohres gewickeltes, dauernd mit kaltem Wasser benetztes Woll-läppchen kühlte. Von dem Destillat sollten 2 ccm zur Reaktion benutzt werden. Das Blattpulver wurde in dem Kölbchen mit 5 ccm Wasser angeschüttelt und die Destillation in derselben Weise durchgeführt.

Zuerst verwendeten wir Morphin-Schwefelsäure (0,2 g Morphinsulfat in 10 ccm konzentrierter Schwefelsäure) zum Nachweis des Formaldehyds[1]; es zeigte sich aber, daß die bei Gegenwart von Formaldehyd eintretende Violettfärbung auch mitunter entstand bei Destillation von Blättern, die nicht mit Formaldehyd behandelt waren. Deshalb konnten wir Morphin-Schwefelsäure nicht gebrauchen, da die Reaktion nicht genügend spezifisch für Formaldehyd war. Als besonders brauchbar erwies sich von den zahlreichen, als Formaldehydreagens empfohlenen Substanzen eine alkalische Phloroglucinlösung. Ganz unbrauchbar aber zur Erkennung von Spuren von Formaldehyd ist die von *v. Grafe*[2]) dafür empfohlene Diphenylamin-Schwefelsäure. Selbst bei dem angeratenen Mischen mit Alkohol konnte man Formaldehyd in einer Konzentration von 0,01 Proz. nicht mehr erkennen.

Wir benutzten zum Nachweis und zur kolorimetrischen Bestimmung des Formaldehyds eine 0,1 proz. wässerige Phloroglucinlösung. 2 ccm derselben wurden mit 1 ccm 10 proz. Kalilauge vor der Ausführung der Reaktion jedesmal frisch gemischt. Zu dem Gemisch setzten wir 2 ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit und schüttelten durch. Je nach der Konzentration des Formaldehyds tritt dabei eine tiefrote bis schwach rosarote Färbung ein. Starke Formaldehydlösungen geben keine Färbung[3]). Die Färbung ist nicht beständig und verschwindet um so rascher, je weniger Formaldehyd vorhanden ist, also je schwächer sie ursprünglich war; die rote Färbung geht allmählich in eine gelbliche, dann in eine blauviolette über. Ist kein Formaldehyd vorhanden, so stellt sich allmählich eine blauviolette Färbung ein. Bei der kolorimetrischen Ermittlung der Formaldehydmenge ist wegen der Unbeständigkeit der Färbung die Intensität der Färbung gleiche Zeiten nach der Herstellung des Gemisches zu messen; wir beobachteten die Färbung 30 bis 45 Sekunden nach dem Mischen.

---

[1]) Zentralbl. f. d. Deutsche Reich 47, 1547, 1919; *Th. Sabalitschka*, Anleitung zum chemischen Nachweis der Gifte, S. 46. Berlin 1923.

[2]) *Grafe*, Ernährungsphysiologisches Praktikum der höheren Pflanzen, S. 265. Berlin 1914.

[3]) *Vanino*, Pharm. Zentralhalle 40, 101, 1899.

Die Vergleichslösungen müssen jedesmal frisch bereitet werden unter Verwendung verschiedener Formaldehydlösungen bekannter Konzentration. Es gibt bei dieser Reaktion

eine Lösung 0,1 : 100, also 2 mg CH_2O in 2 ccm, eine dunkelrote Färbung A,

eine Lösung 0,01 : 100, also 0,2 mg CH_2O in 2 ccm, eine rote Färbung B,

eine Lösung 0,001 : 100, also 0,02 mg CH_2O in 2 ccm, eine rosa Färbung C,

eine Lösung 0,0001 : 100, also 0,002 mg CH_2O in 2 ccm, eine schwachrosa Färbung D.

Durch weitere Differenzierung der Farbintensitäten zwischen Färbung B und D kann man die vorhandenen Formaldehydmengen bis auf 0,01 mg schätzen. Wir hielten zur bequemeren Schätzung die verschiedenen Stärken der Färbung bildlich in einer Skala fest.

Wurde in das Kölbchen eine Lösung von 0,1 mg Paraform in 5 ccm Wasser gegeben und wurden davon 4 ccm überdestilliert, so erhielt man mit 2 ccm des Destillates eine Färbung, die zwischen B und C lag. Sie entsprach ungefähr einem Gehalt von 0,02 mg CH_2O in 1 ccm. Es war also Formaldehyd in das Destillat übergegangen, und zwar mindestens 0,08 mg. Wir zogen 0,2 g Ribesblattpulver mit Wasser aus, dampften den wässerigen Auszug ein und trockneten bis zum konstanten Gewicht. Den Rückstand lösten wir in 4 ccm Wasser, setzten 1 ccm 0,01 proz. Paraformlösung = 0,1 mg CH_2O zu und destillierten wie vorher 4 ccm ab. Nun gaben 2 ccm des Destillates eine schwächere Färbung als vorher. Die Färbung war noch stärker als Färbung C, so daß sicher mehr als 0,04 mg CH_2O überdestilliert waren; es hatte aber das Blattextrakt eine kleine Menge Formaldehyd zurückgehalten. Dieselbe Formaldehydmenge hielt es zurück, wenn wir das Gemisch der Extraktlösung und der Paraformlösung vor der Destillation 24 Stunden stehen ließen. Die gleiche Erscheinung trat ein, als wir ein Extrakt von 0,2 g Blattpulver der Kapuzinerkresse zu dem Versuch verwendeten.

Gemische von je 0,2 g Blattpulver, 4 ccm Wasser und verschiedenen Paraformmengen überließen wir 1 Tag sich selbst, setzten sodann je 1 ccm 10 proz. Phosphorsäurelösung zu, erhitzten 3 Stunden im kochenden Wasserbade unter dem Rückflußkühler und destillierten 4 ccm ab. Es wurde verwendet Pulver der Kapuzinerkressenblätter, das vorher mit Wasser extrahiert, mit Alkohol nachgewaschen und dann wieder getrocknet war. Mit je 2 ccm des Destillates führten wir die Phloroglucinprobe aus. Wir erhielten bei einem Zusatz von

0,1 mg Paraform eine Färbung gleich C,
0,2 ,, ,, ,, ,, wesentlich stärker als C,
1 ,, ,, ,, ,, gleich B.

Wenn wir das Gemisch von 0,1 mg Paraform in derselben Weise ohne Blattpulverzusatz prüften, war die Färbung stärker als C. Es hielten also sowohl die Extrakte wie auch das Blattpulver einen Teil des zugesetzten Formaldehyds derart fest, daß er nicht in das Destillat überging. Dennoch läßt sich in Gemischen mit Blattsubstanz Formaldehyd auf diese Weise kolorimetrisch bestimmen, wenn man zur Herstellung der Vergleichslösungen nicht direkt Formaldehydlösungen bekannter Konzentration, sondern Destillate von den gleichen Mengen Pflanzensubstanz (Blattextrakt oder Blattpulver) und Formaldehydlösungen verschiedener Kon-

zentration benutzt und bei der Darstellung der Destillate genau so verfährt wie bei der Untersuchung der zu prüfenden Pflanzensubstanzen. Blattextrakt und Blattpulver gaben ohne Formaldehydzusatz bei dieser Behandlung die Reaktion nicht.

Nachdem so festgestellt war, daß Formaldehyd nach dieser Methode in Blattextrakt und Blattpulver nachgewiesen und annähernd quantitativ bestimmt werden kann, wandten wir die Methode auf die Extrakte und Blattpulver von Pflanzen an, denen Formaldehyd in der Atmosphäre geboten war. Die Blattextrakte und Blattpulver wurden genau derselben Vorbehandlung unterworfen, wie die Blattextrakte und Blattpulver bei unseren früheren Untersuchungen vor der Zucker- und Stärkebestimmung; zur Bereitung der Blattextrakte und der Blattpulver benutzten wir je 2 g frischer Blattflächen der Kapuzinerkresse. Den Pflanzen war vorher in derselben Weise Formaldehyd in der Atmosphäre geboten worden wie bei den früheren Versuchen, und zwar unter Verwendung einer 2proz. Paraformlösung.

Der Nachweis von Formaldehyd in dem Extrakt der Blätter fiel negativ aus; das ebenso bereitete Extrakt gab aber, wenn man ihm vor der Destillation 0,1 mg Paraform zusetzte, sofort eine hellrote Färbung und, wenn man ihm vor der Destillation 1 mg Paraform zusetzte, eine blutrote Färbung.

Zur Prüfung, wie weit etwa in den wässerigen Blattauszügen ursprünglich vorhandener Formaldehyd beim Eindampfen der Auszüge auf dem Wasserbade sich verflüchtigt, dampften wir einen solchen Auszug nach Zusatz von 20 mg Paraform ein und trockneten den Rückstand wie sonst bei 105° bis zum konstanten Gewicht. Der Rückstand wurde in 5 ccm Wasser gelöst, von der Lösung wurden 4 ccm überdestilliert; 2 ccm des Destillates gaben eine Färbung zwischen B und C. Eine direkt mit 2 ccm einer 0,01proz. Formaldehydlösung (0,2 mg CH_2O) ausgeführte Reaktion war wesentlich stärker. Sie stand zu ersterer im Verhältnis 3 : 1. Da Blattsubstanz, wie bereits oben erwähnt, geringe Mengen von Formaldehyd bei der Destillation zurückhält, sei angenommen, daß die Färbungen bei dem vollkommenen Überdestillieren des Formaldehyds im Verhältnis 2 : 1 gestanden hätten. Es berechnet sich hieraus der Gehalt der 2 ccm des Destillates gleich 0,1 mg, der Gehalt der 5 ccm Extraktlösung vor der Destillation ungefähr gleich 0,25 mg Formaldehyd. Somit sind von 20 mg Formaldehyd nur 0,25 mg beim Eindampfen und Trocknen des Extraktes zurückgeblieben. Die in 2 g frischer Blätter der Formaldehydpflanze gefundene Vermehrung des Zuckers überstieg ganz erheblich den Betrag an Zucker, der 0,25 g Formaldehyd entspricht, so daß schon aus diesem Grunde eine Vortäuschung des höheren Zuckergehaltes durch Formaldehyd nicht möglich ist. Weiterhin ist noch zu bedenken, daß aus einer Lösung von 20 mg Paraform nur 0,25 mg beim Eindampfen zurückblieben. Wollte man annehmen, daß auch die Extrakte der Blätter 0,25 mg Formaldehyd enthielten, so muß man dann in den frischen Blättern mindestens die 80fache Menge annehmen, wobei man nicht berücksichtigt, daß beim Trocknen der Blätter bereits Formaldehyd entweichen dürfte. 20 mg Formaldehyd in 2 g frischer Blätter mit einem Wassergehalt von 90 Proz. entspricht einer Form-

aldehydkonzentration von über 1 Proz. im Zellsaft. Eine solche Konzentration hätte ganz andere Schädigungen der Pflanzen verursachen müssen, als tatsächlich eintraten.

Zur Prüfung des Pulvers der Kapuzinerkressenblätter aus der Formaldehydatmosphäre auf einen etwaigen Formaldehydgehalt verwendeten wir je 2 g frischer Blattflächen, die wir wie bei den früheren Versuchen trockneten, pulverten, mit Wasser extrahierten, mit Alkohol nachwuschen und wieder trockneten. Das so erhaltene Blattpulver versetzten wir mit 5 ccm 3proz. Phosphorsäurelösung, erhitzten 3 Stunden im kochenden Wasserbade am Rückflußkühler und destillierten hierauf 4 ccm über. 2 ccm des Destillates gaben mit der alkalischen Phloroglucinlösung eine Färbung gleich *C*. Ungefähr die gleiche Färbung erhielten wir, wenn wir Blattpulver einer nicht mit Formaldehyd behandelten Pflanze unter Zusatz von 0,1 mg Paraform in derselben Weise behandelten. Es wird somit von der Blattsubstanz der Blätter aus einer Formaldehydatmosphäre, wahrscheinlich von dem Protoplasma, Formaldehyd zurückgehalten, von 2 g frischer Blätter ungefähr 0,1 mg Formaldehyd. Diese Formaldehydmenge ist aber weit geringer, als daß auf sie der bei den Formaldehydpflanzen gefundene Überschuß an Stärke zurückgeführt werden kann.

Damit ist erwiesen, daß eine Beeinträchtigung der früheren Versuche von *Sabalitschka* und unserer Versuche, die eine Ausnutzung des Formaldehyds zum Aufbau höherer Kohlehydrate durch die Pflanze ergaben, durch noch vorhandenen unveränderten Formaldehyd nicht besteht.

Klinische Methode zur Bestimmung des Acetons und der β-Oxybuttersäure in kleinen Harnmengen.

Von

N. O. Engfeldt.

(Aus der Tierärztlichen Hochschule zu Stockholm.)

(*Eingegangen am 7. Dezember 1923.*)

Mit 1 Abbildung im Text.

Lublin[1]) legte im Laufe des vorigen Jahres Methoden für die Bestimmung des Acetons und der β-Oxybuttersäure in Urin und Blut vor, die er hinsichtlich seiner Technik hauptsächlich auf die von mir[2]) zwecks Bestimmung der genannten Körper ausgearbeiteten Methoden gründete. *Lublins* Urinmethode unterzog ich nun einer kritischen Prüfung, über die ich im folgenden ausführlicher berichten werde. Diese Prüfung hat im großen und ganzen ergeben, daß die Methode nicht das Maß an Präzision besitzt, welche eine quantitative Untersuchungsmethode auszeichnen soll. Dasselbe gilt entsprechend auch für die *Lublin*sche Blutmethode.

Lublin wendet bei seiner Urinmethode etwa 0,5 ccm Urin an, der nach der Verdünnung mit Wasser und Ansäuerung mit Essigsäure der Destillation in eine Vorlage unterzogen wird, die eine frisch bereitete Hypojoditlösung enthält. Nach 10 Minuten langer Destillation wird unmittelbar nach dem Ansäuern der Jodverbrauch des Destillates bestimmt. Aus dem erhaltenen Jodverbrauch kann der Gehalt des Urins an sogenanntem Totalaceton berechnet werden. Für die Bestimmung der β-Oxybuttersäure schlägt *Lublin* eine fortgesetzte Destillation unter Hinzutropfen von 20 ccm Chromatschwefelsäuremischung vor (2 g $K_2Cr_2O_7$ + 20 ccm H_2SO_4 + H_2O ad 100 ccm). Der Zufluß der Chromatschwefelsäure wird so reguliert, daß derselbe eine Zeit von 10 Minuten in Anspruch nimmt, wonach die Destillation weitere 10 Minuten verlängert wird. Das andere Destillat wird ebenso wie das erste in Hypojoditlösung aufgefangen und der Jodverbrauch kann unmittelbar danach bestimmt werden. Die Ausbeute wird betreffs des Totalacetons praktisch genommen quantitativ. Für die β-Oxybuttersäure dagegen rechnet *Lublin* mit einer Acetonausbeute von 70 Proz. oder mit ebenderselben Ausbeute, die man mit den von mir ausgearbeiteten Methoden erhält.

---

[1]) *Lublin*, Klin. Wochenschr. **1**, 894, 1922; diese Zeitschr. **133**, 626, 1922.

[2]) *Engfeldt*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **99**, 166, 1917; Acta med. Scand. **52**, 311, 1919; Beiträge zur Kenntnis der Biochemie der Acetonkörper. Dissert. Stockholm, 1920.

Hinsichtlich der Art der Bestimmung des Totalacetons kann man gegen den *Lublin*schen Vorschlag keinen berechtigten Einwand erheben. Die Erfahrung hat gelehrt, daß die Acetonausbeute auch bei einer ziemlich primitiven Destillationsanordnung fast quantitativ wird. Doch kann man mit einer gewissen, wenn auch unbedeutenden Steigerung der Ausbeute, verursacht durch gewisse im Urin vorkommende oder bei der Destillation gebildete, jodverbrauchende, flüchtige Substanzen, rechnen. Trotzdem lassen sich gewisse Punkte in *Lublins* Besprechung über die Art des Verfahrens nicht ohne Bemerkung übergehen. So führt *Lublin* in einer Fußnote an, daß der Essigsäurezusatz zum Urin die „Bindung der Phenole" bezweckt. Dieser Ausspruch führt zweifelsfrei zu der Auffassung, daß *Lublin* glaubt, die letztgenannten Körper befinden sich in freiem Zustande im Urin und würden mit der Essigsäure irgendeine nicht flüchtige Verbindung bilden. Bekanntlich finden sich die Phenolkörper des Urins an solche Stoffe gebunden vor, daß sie unter normalen Verhältnissen nicht flüchtig sind. Durch hydrolytische Spaltung, die in dem Grade günstig beeinflußt wird als die Reaktion des Mediums vom Neutralpunkt abweicht, können die Phenole bei höherer Temperatur aus ihrer esterartigen Verbindung frei werden, in saurer Lösung überdestillieren und durch Jodverbrauch auf das Resultat der titrimetrischen Bestimmung einwirken. Für eine schleunige Dekomposition der Acetessigsäure ist es notwendig, entweder bei saurer oder alkalischer Reaktion zu arbeiten. Bei neutraler Reaktion besitzt nämlich das Acetacetat auch bei Kochtemperatur eine *nicht unbedeutende Haltbarkeit*, was aus folgendem von mir[1]) bei einer früheren Gelegenheit ausgeführten Versuch hervorgeht:

1. 10 ccm Na-Acetacetat (25 mg) wurden bis zum Kochen eine Minute erhitzt, abgekühlt + $FeCl_3$[2]): violett.
2. 10 ccm Na-Acetacetat (25 mg) wurden bis zum Kochen 2 Minuten erhitzt, abgekühlt + $FeCl_3$: violett.
3. 10 ccm Na-Acetacetat (25 mg) wurden bis zum Kochen 5 Minuten erhitzt, abgekühlt + $FeCl_3$: violett.
4. 10 ccm Na-Acetacetat (25 mg) wurden bis zum Kochen 7½ Minuten erhitzt, abgekühlt + $FeCl_3$: schwach violett.
5. 10 ccm Na-Acetacetat (25 mg) wurden bis zum Kochen 10 Minuten erhitzt, abgekühlt + $FeCl_3$: 0.

Bei Anwesenheit von Säure oder Lauge, letztere in mäßiger Konzentration, erfährt die Acetessigsäure bzw. deren Alkalisalze bereits nach 1 Minute langem Kochen eine quantitative Ketonspaltung. Bei der Bestimmung des Acetessigsäuregehaltes — des Totalacetongehaltes — im Urin ist die Bewegungsfreiheit jedoch bis zu einer Destillation in saurer Lösung begrenzt, und zwar aus dem Grunde, weil vorhandene Glykose bei der Destillation in alkalischer Lösung *bedeutende* Mengen flüchtiger, jodverbrauchender Substanzen verursacht[3]). Im molekularen Zustande besitzt die Acetessigsäure allerdings ihren niedrigsten Stabilitätsgrad[4]). Schon

[1]) *Engfeldt*, a. a. O. „Beiträge" usw.

[2]) *Gerhard*sche Probe auf Acetessigsäure.

[3]) *Engfeldt*, Skand. Arch. f. Physiol. **32**, 323, 1914.

[4]) *Engfeldt*, „Beiträge" usw., a. a. O. (Betreffs der außerordentlich schnell verlaufenden Acetonspaltung bei Anwesenheit von Eiweißstoffen und deren Hydrolyseprodukten siehe die genannte Arbeit des Verfassers.) (Vgl. *Widmark*, Acta med. Scand. **53**, 393, 1920.)

bei $p_H = 2$ ist die Dissoziation der Säure vollständig zurückgedrückt, aber vom praktischen Gesichtspunkte findet eine ausreichend schnelle Dekomposition von Acetessigsäure bei Kochtemperatur selbst bei einer wesentlich niedrigeren H^+-Konzentration statt. Am bequemsten wird dieselbe durch Anwendung einer schwachen organischen Säure reguliert. Die bereits früher vorgeschlagene Essigsäure ist im vorliegenden Falle um so viel geeigneter, als sie durch Dekomposition das Resultat bei der folgenden Oxydation mit Chromsäure nicht beeinflußt. Wird andererseits die H^+-Konzentration niedrig gehalten, so findet während der kurz dauernden ersten Destillation keine oder nur eine bedeutungslose hydrolytische Spaltung der im Urin vorhandenen Phenolkörper statt. Weiter ist der technische Vorteil hervorzuheben, daß die Destillation bei saurer Reaktion unter wesentlich geringerem Schäumen als bei neutraler oder alkalischer vor sich geht. Die Umwandlung der β-Oxybuttersäure ist allerdings eine wesentlich schwerere Aufgabe. Bei schwacher Konzentration der Chromsäure und langwieriger Destillation — 5 bis 6 Stunden — kann die Acetonausbeute gewiß bis zu 95 Proz. heraufgetrieben werden. Quantitativ wird sie erfahrungsgemäß mit dem genannten Oxydationsmittel jedoch nicht. Die diesbezügliche Ursache liegt darin, daß außer der Reaktion: β-Oxybuttersäure $\longrightarrow$ Acetessigsäure $\longrightarrow$ Aceton auch mehrere Nebenreaktionen stattfinden. Somit kann die zuerst gebildete Acetessigsäure bei der Anwesenheit von Oxydationsmitteln in Essigsäure und Glyoxylsäure zerfallen, welch letztere unmittelbar zu Oxalsäure aufoxydiert wird. Letztgenannter Reaktionsverlauf findet quantitativ statt, wenn als Oxydationsmittel Permanganat in neutraler oder schwach saurer Lösung angewendet wird[1]):

$$CH_3CH\overset{OH}{\diagup}CH.COOH + 2\,O = CH_3C\overset{OH}{\underset{\searrow O}{\diagdown}}$$

$$+ OC\overset{H}{\diagup}COOH \longrightarrow (+O) \longrightarrow \begin{matrix}COOH\\COOH\end{matrix}.$$

Bei der Anwesenheit von Schwefelsäure[2]) kann ferner die β-Oxybuttersäure in die Crotonsäure überführt werden, welche weiter bei der Oxydation auf eine Weise beeinflußt werden kann, die der bei der Acetessigsäure angeführten ähnlich ist. Die Crotonsäure wird hierbei vermutlich in Acetaldehyd und Glyoxylsäure gespalten[3]).

$$CH_3\overset{OH}{\overset{\diagup}{C}}H\text{—}CH_2.COOH \underset{(-H_2O)}{\longrightarrow} CH_3CH{=}CH.COOH; \quad (1)$$

$$CH_3CH{=}CH.COOH + 2\,O = CH_3CHO + OC\overset{H}{\diagup}COOH. \quad (2)$$

Aus dem kurz vorher Angeführten geht also hervor, daß die Acetonausbeute bei der Oxydation der β-Oxybuttersäure in hohem Grade auf den Versuchsanordnungen beruht, vor allem auf der Konzentration der Chromat-

[1]) *Derselbe*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **100**, 93, 1917.

[2]) Bereits bei einer Konzentration von 10 Proz. H_2SO_4 ist nach *Araki* die Crotonsäurebildung erheblich. Zeitschr. f. physiol. Chem. **18**, 2, 1893.

[3]) Bei dem von mir angeführten Destillationsversuch mit der β-Oxybuttersäure bei Anwesenheit einer größeren Menge Schwefelsäure, aber geringer Quantität Chromat erhielt ich ein Destillat mit beachtenswertem Acetaldehydgehalt.

schwefelsäure. Bei den von mir ausgearbeiteten Methoden für die Bestimmung der β-Oxybuttersäure in Urin und Blut geht die Konzentration der Schwefelsäure bis zu etwa 6 Proz., der Chromatgehalt bis zu 0,8 bis 0,9 Proz. Dadurch, daß man bei der Durchführung der Destillation ein großes Wasservolumen anwendet und das Oxydationsmittel auf einmal zusetzt, erreicht man auf bequeme Weise den Vorteil vergleichsweise geringer Variationen in der Konzentration des Oxydationsmittels bzw. der Schwefelsäure, was andererseits zu konstanten Acetonausbeuten beiträgt, in den genannten Verhältnissen etwa 70 Proz.

Gehen wir nunmehr zu einer Prüfung der Schwefelsäure- und Chromatkonzentrationen über, mit denen *Lublin* arbeitet, so finden wir, daß während der ersten Hälfte der Oxydation, in der die Chromatschwefelsäure tropfenweise hinzufließt, die Konzentration der Destillationsflüssigkeit dieser Stoffe in jedem Augenblick wechseln muß. Bei Beginn des Hinzutropfens, wenn die Konzentration der Chromatschwefelsäure gering ist, können wir mit einer langsam verlaufenden Oxydation mit vergleichsweise guten Acetonausbeuten rechnen, gegen Ende mit einer hastigen Destruktion der β-Oxybuttersäure, wobei die auf S. 558 angegebenen Nebenreaktionen einsetzen und die Acetonausbeute herabdrücken. Auch wenn die Destillation langsam geschieht, muß man gegebenenfalls damit rechnen, daß eine gewisse Menge mit jedem Zeitintervall von 10 Minuten überdestilliert. Die Vorschrift in *Lublins* letzter Arbeit, daß die Destillation „mit sehr niedrigem, gegen Luftzug geschützten Bunsenbrenner" geschehen soll, deutet sicherlich auf gewisse Beobachtungen betreffs der Bedeutung hin, welche die Art der Destillationsdurchführung auf die Acetonausbeute ausübt. Jedoch die diesbezüglichen Vorschriften sollten mit Rücksicht auf den außerordentlichen Einfluß, den die Destillationsgeschwindigkeit in der Tat ausübt, notwendigerweise durch genaue Angaben der Destillatmenge, die in der Zeiteinheit übergehen dürfte, vervollständigt werden, — *eine Vorschrift, die sich leicht erteilen läßt, deren exakte Durchführung jedoch auf Grund der praktischen Umstände unzweifelhaft ziemlich schwer ist.* Je langsamer die Destillation geht, desto weniger vermindert sich das Volumen der Destillationsflüssigkeit und damit auch die Konzentration der Chromatschwefelsäure. Wenn wir außerdem beachten, daß die Acetonausbeute so viel geringer wird, je höher die vorhandene Chromatschwefelsäurekonzentration ist, so erhellt durchaus die Bedeutung genauer Vorschriften betreffs der Geschwindigkeit, mit der die fragliche Destillation durchgeführt werden muß. Kehren wir nun zurück zu einem Detail, nämlich der Frage über die Konzentration der Schwefelsäure in der Destillationsflüssigkeit bei der Anwendung des *Lublin*schen Verfahrens, so finden wir, daß die Gesamtmenge Schwefelsäure bis zu etwa 7,2 g geht. Die ursprüngliche Destillationsflüssigkeit beträgt etwa 26 ccm. Bei sehr langsamer Destillation — die Voraussetzung für eine quantitative Überdestillation des gebildeten Acetons ist zweifellos der Erhalt von *etwas* Destillat — wagen wir anzunehmen, daß während der ersten Destillation wenigstens 5 ccm übergehen und daß beim Hinzutropfen der Chromatschwefelsäure während weiterer 10 Minuten die Destillationsflüssigkeit weitere 5 ccm Destillat bewirkt hat. Es würden somit 16 ccm übrigbleiben. Addiert man hierzu 20 ccm, die hinzugesetzte Chromatschwefelsäure, so kann das Volumen der Destillationsflüssigkeit nach 20 Minuten langer Destillation auf 36 ccm geschätzt werden. Ihr Gehalt an Schwefelsäure geht folglich bei dieser Phase der Destillation bis zu 20 Proz. oder mehr als dem Dreifachen beim Vergleich mit demjenigen, was nach meinen Vorschriften für

die Spaltung der β-Oxybuttersäure angegeben ist. Bei Annahme der oben angeführten Destillationsgeschwindigkeit ist bereits nach etwa 2 Minuten langem Hinzutropfen von Chromatschwefelsäure die Schwefelsäurekonzentration in der Destillationsflüssigkeit 6 Proz. Die hierunter angeführten Versuche zeigen auch (S. 561), daß die Acetonbildung während dieser Zeit sehr unbedeutend ist. Bei einer Schwefelsäurekonzentration von etwa 6 Proz. (+ 0,9 Proz. Chromat) zeigten meine vorhergehenden Versuche, daß die Acetonausbeute nach 25 Minuten dauernder Destillation etwa 70 Proz. wird. Je höher die Konzentration der Schwefelsäure ist, desto hastiger wird bei der Anwesenheit soeben genannter Oxydationsmittel die β-Oxybuttersäure beeinflußt. Dieses geschieht jedoch auf Kosten der Acetonausbeute. Nach dem *Lublin*schen Vorschlag erreicht die Schwefelsäurekonzentration schon nach etwa 2 Minuten langem Hinzutropfen diese Höhe, um unmittelbar danach während des folgenden 8 Minuten dauernden Hinzutropfens von Chromatschwefelsäure weiter zu steigen und schließlich bis zu 20 Proz. und darüber zu gehen.

Während der beiden ersten Minuten der Destillation ist die Einwirkung, die die β-Oxybuttersäure erfährt, wie soeben hervorgehoben, vom Gesichtspunkte des Resultats der Titration bedeutungslos. Während weiterer 18 Minuten dauernder Destillation ist die Schwefelsäurekonzentration im Durchschnitt wesentlich höher als 6 Proz., woraus mit Rücksicht auf die vorherigen Ausführungen folgt, daß die Gesamtausbeute an Aceton nicht 70 Proz. erreichen kann. *Lublin* berechnet seine Werte jedoch nach dieser Ausbeute und führt als Beleg für die Richtigkeit dieser Berechnungsweise eine Anzahl gut übereinstimmender Parallelanalysen nach der von *Magnus-Levy* angegebenen optischen Methode an. Diese Übereinstimmung im Resultat der beiden Methoden kann kaum auf andere Weise als dadurch erklärt werden, daß sich *Lublin* gewisser konsequent durchgeführter Fehlgriffe — Beobachtungs- oder Rechenfehler — beim Gebrauch einer von beiden Methoden schuldig gemacht hat. Ich werde nämlich im folgenden zeigen, daß die *Lublin*sche Methode betreffs der β-Oxybuttersäure mit einer Ausbeute arbeitet, die bestenfalls bis auf etwa 55 Proz. kalkuliert werden kann. (Tabelle I.) *Wendet man beim Gebrauch der Lublinschen Methode den „Siebzigprozentfaktor" bei der Berechnung der Resultate an, so erhält man um 27 Proz. zu niedrige Werte.* In sehr geringem Grade wird diese durch die flüchtigen jodverbrauchenden Substanzen kompensiert, die bei der Oxydation gewisser normaler Urinbestandteile sowie vorhandener Glykose gebildet werden. Im Gegensatz zu *Lublins* Behauptung hat es sich gezeigt, daß seinem Vorschlage gemäß sowohl bei der Oxydation einer Glykoselösung als auch bei derjenigen eines normalen Urins jodverbrauchende Substanzen gebildet werden, selbst wenn die Menge keinen größeren Umfang erreicht.

Beim Versuch mit Glykose-Wasserlösung erhielt ich ein zweites Destillat, das ganz nach der vorhandenen Zuckermenge Jod in wechselnden Mengen verbrauchte — 2,5 cg (0,5 ccm 5 proz.) verbrauchten somit im Durchschnitt 0,38 ccm n/100 Jod, 5 cg (0,5 ccm 10proz.) im Durchschnitt 0,85 ccm n/10 Jod. 0,5 ccm normalen Urins, analysiert nach dem *Lublin*schen Verfahren, verbrauchten im Durchschnitt 0,55 ccm n/100 Jod mit Variationen zwischen 0,5 und 0,65 ccm.

Auch wenn wir berechtigten Grund zu der Annahme haben, daß in stark zuckerhaltigem, diabetischem Urin die Konzentration gewöhnlich vorkommender Urinbestandteile niedriger als im normalen Urin ist, so deuten die soeben angeführten Ziffernwerte doch die keineswegs unbe-

deutende Einwirkung auf das Resultat an, das eine direkte Oxydation des Urins zur Folge hat.

Versuche zwecks Erforschung der Acetonbildung bei der Destillation nach Lublin.

1. 4,02 mg β-Oxybuttersäure (als Ca-Zn-Salz) + 25 ccm H_2O + 1 ccm 10 proz. CH_3COOH wurden 10 Minuten lang äußerst vorsichtig destilliert, wobei 5 ccm Destillat erhalten wurden. Nach Auswechslung der Vorlage ließ ich während des Verlaufes von 2 Minuten 4 ccm Chromatschwefelsäure hinzutropfen. Jodverbrauch: 0.

2. Dasselbe mit dem Unterschied, daß das Hinzutropfen des Chromats während ungestümer Destillation geschah[1]): Jodverbrauch: 1,6 ccm n/100 = 0,2768 mg β-Oxybuttersäure oder 6,9 Proz.

3. Destillationsgeschwindigkeit wie im Fall 1. Nach 5 Minuten langem Hinzutropfen von 10 ccm Chromatschwefelsäure: Jodverbrauch 4,45 ccm n/100 Jod = 0,7698 mg β-Oxybuttersäure = 19 Proz.

Nach weiterem 5 Minuten langem Hinzutropfen: 6,5 ccm n/100 J = 1,1235 mg = 27,9 Proz.

Nach fernerer 10 Minuten langer Destillation: 1,75 ccm n/100 J = 0,3027 mg = 7,5 Proz.

Gesamtausbeute β-Oxybuttersäure 54,4 Proz.

Oxydationsversuche mit β-Oxybuttersäure nach Lublin, den Einfluß der Destillationsgeschwindigkeit auf die Acetonausbeute veranschaulichend.

Tabelle I.

Nr.	Zugesetzte β-Oxybuttersäure mg	Jodverbrauch ccm n/100 J	β-Oxybuttersäure, berechnet mg	Ausbeute Proz.	Bemerkungen
1	1,608	3,3	0.5709	35,5	kräftige Destillation
2	1,608	3,8	0,6574	40,9	gewöhnliche Destillation
3	1,608	4,7	0,7610	47,3	langsame Destillation
4	4,02	9,3	1,609	40,0	gewöhnliche Destillation
5	4,02	10,4	1,799	44,7	„ „
6	4,02	13,15	2,275	56,6	1. Dest. 7 ccm; 2. Dest. 14 ccm
7	4,02	12,1	2,093	52,1	1. „ 8,5 „ 2. „ 22,5 „
8	4,02	12,65	2,188	54,4	1. „ 7 „ 2. „ 16 „
9	4,02	13,27	2,296	57,1	1. „ 7 „ 2. „ 12 „

Die Acetonausbeute in den vier zuletzt angeführten Bestimmungen, in denen die Destillation mit großer Langsamkeit vonstatten ging, erreichte im Durchschnitt 55 Proz. der theoretischen. Daß andererseits

[1]) Zweifelsohne wird auch bei schwacher Destillation Aceton gebildet, obwohl dasselbe bei den genannten Versuchsbedingungen während des Verlaufs von 2 Minuten nicht zum Überdestillieren kommt. Bei ungestümer Destillation ist dieses der Fall, wie es der Versuch 2 ergibt.

die Destillationsgeschwindigkeit nicht beliebig weit zurückgehalten werden kann, zeigt folgender Versuch: Eine Lösung von 3,125 mg Aceton in 25 ccm Wasser wurde *äußerst* langsam einer 10 Minuten langen Destillation unterzogen (3 ccm Destillat). Bei der Titrierung wurden nur 2,031 mg oder 65 Proz. der zugesetzten Menge wiedergefunden.

Ich bin nach wie vor überzeugt, daß eine Vorbehandlung des Urins zwecks Beseitigung eventuell vorhandenen Zuckers und gewisser anderer Stoffe für den Erhalt gleichmäßiger und zuverlässiger Ausbeuten unerläßlich ist.

An dieser meiner Meinung nach wohl begründeten Auffassung festhaltend, werde ich nun zu dem Bericht über die Änderungen in meiner früher beschriebenen Makromethode übergehen, die bei der Bearbeitung kleiner Urinmengen nötig sind. Hierbei möchte ich zunächst folgendes bemerken.

Durch wesentliche Einschränkung der Urinmenge und des Volumens der Destillationsflüssigkeit sowie nach *Lublins* Vorschlag durch Aufnahme des Destillates in eine frisch bereitete Hypojoditlösung kann die in meiner Makromethode angegebene Zeit für die Durchführung der Bestimmungen unzweifelhaft bedeutend verkürzt werden.

Lublins Vorschlag, das Acetondestillat in eine fertige Hypojoditlösung aufzunehmen, kann allerdings bei oberflächlicher Betrachtung mit Rücksicht auf die hastige Dekomposition, der Hypojodit nach allgemeiner Ansicht bei der Aufbewahrung verfällt, Zweifel erwecken. Im Hinblick auf einen vorhergehenden Versuch[1]), der gezeigt hat, daß Hypojodit im Gegensatz zu der seinerzeit herrschenden Auffassung einen relativ hohen Stabilitätsgrad besitzt, erscheint der *Lublin*sche Vorschlag, das Acetondestillat in eine kurz vorher fertiggestellte Hypojoditlösung aufzunehmen, keineswegs ungeeignet. Folgender Versuch erbringt einen unwiderleglichen Beweis für einen solchen Stabilitätsgrad einer frisch bereiteten Hypojoditlösung von unten angegebener Zusammensetzung, daß sich irgendeine Dekomposition durch Jodatbildung nach 15 Minuten langer Aufbewahrung bei Zimmertemperatur chemisch nicht nachweisen läßt:

25 ccm H_2O + 5 ccm NaOH (25 proz.) + 10 ccm n/100 Jod wurden 15 Minuten lang aufbewahrt und danach 1 ccm 1 proz. Acetonlösung (zehnfacher Überschuß) zugesetzt. Unmittelbar danach entstand eine Fällung von Jodoform. Nach 15 Minuten langer Aufbewahrung bei Zimmertemperatur wurde mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert: Gelbfärbung, auf die Anwesenheit von freiem Jod hindeutend, konnte *nicht* wahrgenommen werden, doch entstand beim Zusatz von Stärkekleister Blaufärbung. Für die Entfärbung reichte ein Zusatz von einigen Tropfen n/100 $Na_2S_2O_3$ hin.

Soeben besprochenes Detail bei der Durchführung der Bestimmung enthält zweifelsohne einen vom klinischen Gesichtspunkte beachtenswerten praktischen Vorteil. Durch gewisse Änderungen in meinem für die Makromethode angegebenen Verfahren hinsichtlich der Vorbe-

---

[1]) *Engfeldt*, Skand. Arch. f. Physiol. **32**, 266, 1914.

handlung des Urins erreicht man außerdem ebenfalls eine Zeitersparnis. Letztgenannte Maßregeln sind meiner Meinung nach so einfach und wenig zeitraubend — die vielleicht abschreckend wirkende Filtrierung bedient sich selbst und ist in einigen wenigen Minuten durchgeführt —, daß die Begründung der Nachteile betreffs dieses Details in der Art des Verfahrens als ungenügend angesehen werden kann (s. *Lublin*). Ich richtete außerdem und dieses mit Rücksicht auf eine erworbene Kenntnis der praktischen Schwierigkeiten, die bei der Durchführung chemisch-klinischer Untersuchungen unvermeidlich sind, meine Aufmerksamkeit besonders auf die Notwendigkeit, eine solche Anleitung in der Methodik zu geben, daß das Analysenresultat in keinem nennenswerten Grade von unvermeidlichen, individuellen Variationen in der Ausführungsart der Bestimmungen beeinflußt wird. Schließlich sei weiter hervorgehoben, daß ich gewisse Änderungen in der Konzentration des Oxydationsmittels in der Absicht vorschlagen werde, die Zeit für die Umwandlung der β-Oxybuttersäure abzukürzen, ein Vorteil, der jedoch auf Kosten der dabei erhaltenen Acetonausbeute zustande kommt.

Die Methode.

Apparate.

1. Ein Destillationsapparat nach beigefügter Abbildung, mit Gummipfropfen von bester Beschaffenheit.
2. Eine Ostwaldpipette à 1 ccm zwecks Abmessung des Urins.
3. Eine Bürette, die eine sichere Ablesung auf 0,05 ccm gestattet.
4. Erforderliche Vollpipette und andere Meßgefäße.

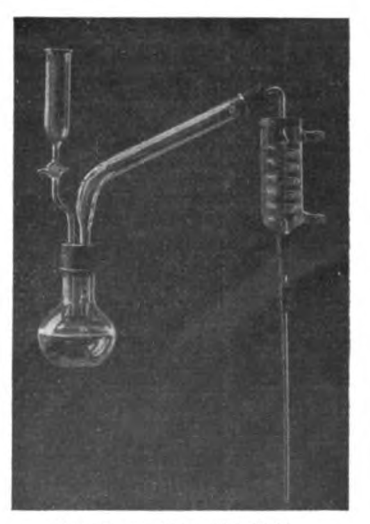


Abb. 1. 1/6 der natürl. Größe.

Lösungen.

1. n/100 Jod (bereitet aus n/10), versetzt mit 5 Proz. Jodkalium (aufbewahrt in einem Gefäß von dunklem Glase *unbegrenzt* haltbar).
2. n/100 Natriumthiosulfat, versetzt mit einigen Tropfen Natriumhydroxyd (25 Proz.) (mehrere Monate haltbar).
3. Natriumhydroxydlösung, etwa 25 proz., bereitet aus der besten des Handels (Alkohol depur. oder e metallo). Nach einer einige Wochen dauernder Aufbewahrung wird die vollkommen klare Flüssigkeit von der abgesetzten Fällung abgegossen. Aufbewahrung in einem Gefäß mit Glasstöpsel, eventuell mit paraffiniertem Korken. (Achtung! Kein Gummikork.)
4. Schwefelsäure, 25 Vol.-Proz., bereitet aus 25 ccm konzentrierter reiner Schwefelsäure + destilliertem Wasser zu 100 ccm.

5. Lösliche Stärke, 1 Proz., versetzt mit etwa 15 Proz. reinem Natriumchlorid (zur Konservierung).

6. Chromatschwefelsäure, auf folgende Weise bereitet: 2 g reines Kaliumchromat wird in einer Mischung von 20 ccm konzentrierter reiner Schwefelsäure und Wasser zu 100 ccm gelöst, 5 Minuten lang bis zum Kochen erhitzt, abgekühlt und zum ursprünglichen Volumen mit destilliertem Wasser verdünnt.

7. Natriumchloridlösung, 3 proz., aus chemisch reinem Natriumchlorid.

8. Ammoniak, 5 proz., *acetonfrei* [eventuell aus chemisch reinem Ammoniumsulfat bereitet[1])].

9. Bleiessig, Ph. U. S. A., auf folgende Weise bereitet: 180 g Bleiacetat + 110 g pulverisiertes Bleioxyd werden auf dem Wasserbade geschmolzen. Diese Masse wird in etwa 800 ccm destillierten Wassers gelöst, einige Minuten bis zum Kochen erhitzt, filtriert und auf ein spez. Gew. 1,235 bei 25°C eingestellt.

10. Essigsäure, konzentriert, chemisch rein.

11. Destilliertes Wasser von bester Beschaffenheit.

Mit den Reagenzien werden *einige*[2]) Blindproben ausgeführt. Ein geringer Jodverbrauch (0,1 bis 0,2 ccm n/100) scheint unvermeidlich zu sein. Eine Korrektion betreffs desselben muß bei Ausführung der eigentlichen Bestimmung vorgenommen werden.

Vorbehandlung des Urins.

1 ccm Urin (mit der Ostwaldpipette abgemessen) wird mit etwa 20 ccm destillierten Wassers gemischt, mit 2 ccm NaCl + 2 ccm H_3N + 3 ccm Bleiessig[3]) und destilliertem Wasser zu 100 ccm versetzt, kräftig umgeschüttelt und nach etwa 10 Minuten langem Stehenlassen klar filtriert. Eine bei der Aufbewahrung des Filtrates entstehende schwache Opalisierung ist ohne Bedeutung.

Bestimmung des Gesamtacetons.

50 ccm Filtrat — eventuell 25 ccm[4]) — werden mit Wasser zu 60 ccm verdünnt, mit 5 Tropfen konz. Essigsäure angesäuert, mit einer Spur Talk versetzt und einer 10 Minuten dauernden kräftigen Destillation unterzogen. Das Destillat wird in einer Vorlage aufgenommen, die 25 ccm H_2O + 5 ccm NaOH + 10 bis 20 ccm n/100 Jod enthält. Diese Mischung soll unmittelbar vor Beginn der Destillation bereitet werden. Die Abflußröhre des Kühlers soll etwa 1 ccm *über* der Oberfläche der Vorlageflüssigkeit angebracht sein. Die Spitze des Kühlers nach *Lublins* Vor-

---

[1]) Gewöhnliches Gaswasserammoniak ist selten acetonfrei.

[2]) Die *erste* Blindprobe wird erfahrungsgemäß im allgemeinen fehlerhaft. Einen neuen Destillationsapparat muß man durch langwierige Destillation säubern.

[3]) Diese Menge reicht zur Ausfällung von Zucker bis zu 10 Proz.

[4]) Bei β-Oxybuttersäurewerten, die 8 g-Prom. übersteigen, sollen nur 25 ccm gebraucht werden.

schlag in die Vorlageflüssigkeit reichen zu lassen, ist mit großer Gefahr für ein Zurücksaugen verbunden und übt an und für sich keine vorteilhafte Einwirkung auf das Resultat aus[1]).

Nach 10 Minuten langer Destillation wird die Flamme einen Augenblick unter gleichzeitiger Öffnung der Trichterröhre fortgenommen. Hierbei fließt der im Spiralkühler befindliche Teil des Destillates nieder. Der Jodverbrauch kann nach der Ansäuerung mit 5 ccm Schwefelsäure durch Titrierung mit Thiosulfat unmittelbar bestimmt werden. Hiermit wartet man jedoch besser, bis die andere Destillation in Gang gekommen ist.

1 ccm n/100 Jod = 0,1 mg Aceton. Ist die Destillation mit 0,5 ccm Urin (50 ccm Filtrat) ausgeführt, so erhält man den Acetongehalt in Gramm per Liter Urin durch Multiplikation mit dem Faktor 0,2.

Bestimmung der β-Oxybuttersäure.

Nach Abschluß der ersten Destillation und Wechseln der Vorlage gegen eine andere, versehen mit einer ex tempore bereiteten Hypojoditlösung (10 bis 20 ccm n/100 J) wird der Inhalt des Destillationskolbens wieder bis zum Kochen erhitzt. In die Trichterröhre werden 15 ccm Chromatschwefelsäure gebracht, die man auf einmal durch Öffnen des Trichterkrahnes unter der Beobachtung herniederfließen läßt, daß am Ende keine direkte Verbindung mit der Außenluft stattfindet. Nach Herniederfließen der Chromsäure kommt die Destillation für einige Augenblicke zum Stillstand. Von dem Zeitpunkt an, in welchem dieselbe wieder in Gang kommt, soll sie unter Hinzutropfen von Wasser aus der Trichterröhre lebhaft fortgehen unter Beobachtung, daß das Volumen der Destillationsflüssigkeit konstant gehalten wird (60 ccm, *nicht* mehr). Dieses Niveau soll zu Anfang an der äußeren Kolbenwand markiert werden. Beim Abschluß der Destillation soll zwecks Herniederfließens des Kondenswassers in die Vorlage das bei der Durchführung der ersten Destillation beschriebene Verfahren angewendet werden.

Der Jodverbrauch des Destillates wird nach der Ansäuerung mit Schwefelsäure durch Titrierung mit Thiosulfat bestimmt. 1 ccm Jod = 0,3 mg β-Oxybuttersäure. Ist die Destillation mit 0,5 ccm Urin (50 ccm Filtrat) ausgeführt, so bekommt man den β-Oxybuttersäuregehalt in Gramm per Liter Urin durch Multiplikation mit dem Faktor 0,6.

0,5 ccm normaler Urin verbraucht nach der Behandlung mit soeben angegebenem Fällungsmittel:

Erstes Destillat: im Durchschnitt 0,05 ccm n/100 Jod.
Zweites „ „ „ 0,30 „ n/100 „

[1]) Nach Versuchen, die hier nicht näher angeführt werden.

Aus den letzten Ausführungen geht die Begrenzung der Methode nach unten hervor. Die Werte, die betreffs des Gesamtacetongehalts bis zu 0,01 g-Prom. (1 mg-Proz.) und hinsichtlich des β-Oxybuttersäuregehaltes bis zu 0,18 g-Prom. (18 mg-Proz.) gehen, müssen somit als physiologische betrachtet werden. Dieses muß berücksichtigt werden, und eine eventuelle Korrektion des erhaltenen Resultats ist somit besonders bei niedrigen Werten erforderlich.

Beleganalysen und Diskussion derselben.

Material.

Na-Acetacetatlösung, bereitet durch kalte Verseifung des Äthylesters mit Natriumhydroxyd und darauf folgende Äther- und Vakuumbehandlung der mit Salzsäure neutralisierten Lösung. Letztgenannte Behandlung hat die Aufgabe, Äthylalkohol und Aceton tunlichst zu beseitigen, von denen der erstere bei der Verseifung gebildet wird, das letztere durch den bei der Aufbewahrung allmählich eintretenden Zerfall des Acetacetats. Zur Zeit der Durchführung der Versuche waren etwa 10 Proz. des von Anfang an vorhandenen Acetacetats in Aceton zerfallen.

Versuche mit normalem Urin, versetzt mit Glykose und Acetacetat.

Blindversuche mit Urin + Glykose.

1 ccm Urin + 0,05 Glykose wurden auf die in der Beschreibung des Verfahrens angegebene Weise gefällt. 50 ccm Filtrat wurden destilliert. Jodverbrauch: 0,05 ccm n/100 J.

5 ccm Acetacetatlösung verbrauchten nach der Destillation eine Jodmenge, die 0,541 mg Aceton entspricht.

1. 1 ccm Urin + 0,02 g Glykose + 0,2164 mg Acetacetat (als Aceton gerechnet) wurden gefällt.

50 ccm Filtrat wurden destilliert: 1,15 ccm n/100 J; 1,1 − 0,05 = 1,05; 2 × 1,05 = 0,2031 mg Aceton oder 95,5 Proz.

2. 1 ccm Urin + 0,05 g Glykose + 0,2164 mg Acetacetat: 2,15 ccm n/100 J = 96,1 Proz.

3. 1 ccm Urin + 0,02 g Glykose + 0,541 mg Acetacetat: 5,5 ccm n/100 J = 98,3 Proz.

4. 1 ccm Urin + 0,05 g Glykose + 0,541 mg Acetacetat: 5,4 ccm n/100 J = 96,4 Proz.

5. 1 ccm Urin + 0,02 g Glykose + 1,082 mg Acetacetat: 11,0 ccm n/100 J = 98,3 Proz.

6. 1 ccm Urin + 0,05 g Glykose + 1,082 mg Acetacetat: 10,8 ccm n/100 J = 96,4 Proz.

Medium: 96,8 Proz. mit wenigstens 96,1 und höchstens 98,3 Proz. Ausbeute.

Theoretisch entsprechen 1 ccm n/100 J 0,0967 mg Aceton. Nimmt man aber Rücksicht auf die im vorhergehenden gefundenen Ausbeuten, im Durchschnitt 96,8 Proz., so kann der vorhergenannte Faktor auf 0,1 korrigiert werden.

Aus den Versuchen geht weiter hervor, daß das Acetacetat sehr wenig durch Adsorption von der bei der Vorbehandlung gebildeten Fällung beeinflußt sein kann. Im Gegensatz hierzu zeigte es sich, daß freies Aceton in einem gewissen Grade, wenn auch nicht besonders viel, adsorbiert wird. Bei den im Anschluß an die Vorschrift der Methode ausgeführten Versuchen mit Urin, versetzt mit 5 Proz. Glykose und 0,250 bzw. 0,750 mg Aceton, ging der Jodverbrauch bis zu Werten, die einem Verlust von 11,1 bzw. 9,8 Proz. entsprachen. Beim Versuch mit geringeren Mengen als den obengenannten kann zweifellos ein größerer Verlust vorausgesetzt werden, aber mit Rücksicht auf das Resultat bei den Acetacetatversuchen, in denen wesentlich geringere Mengen freien Acetons vorhanden waren, kann die Adsorptionswirkung der Bleifällung als ziemlich begrenzt angesehen werden, bei der praktischen Anwendung der Methode sogar als bedeutungslos.

Als weiteren Beweis hierfür will ich im folgenden einige Analysen anführen, die ich mit diabetischem Harn teils direkt, teils nach vorhergehender Fällung vornahm. Im erstgenannten Falle wurde 1 ccm Urin mit destilliertem Wasser auf 100 ccm verdünnt. 50 ccm hiervon wurden nach Ansäuerung mit Essigsäure destilliert und der Jodverbrauch gemessen. Im zweiten Falle fällte ich 1 ccm des Urins auf vorher beschriebene Weise und destillierte 50 ccm Filtrat nach Ansäuerung.

Tabelle II.

	1	2	Differenz 1–2		3	4	Differenz 3–4	
Nr.	Direkte Destillation n/100 J ccm	Fällung und Destillation n/100 J ccm	n/100 J ccm	In Proz. berechnet aus Kolumne 2	Acetongehalt in g pro Liter bei direkter Destillation, berechnet nach d. theoretischen Faktor 0,0967	Acetongehalt in g pro Liter bei Fällung und Destillation, berechnet nach d. theoretischen Faktor 0,1	pro Liter g	In Proz. berechnet aus Kolumne 4
1	0,9	0,85	0,05	5,9	0,174	0,170	+ 0,004	2,4
2	0,8	0,75	0,05	6,7	0,155	0,150	+ 0,005	3,3
3	6,3	6,2	0,10	1,6	1,218	1,240	— 0,022	1,8
4	6,2	6	0,20	3,3	1,119	1,200	— 0,001	0,08
5	4,95	4,79	0,20	4,2	0,957	0,950	+ 0,007	0,7

Bei der Bestimmung des Gesamtacetongehaltes nach der von mir vorgeschlagenen Makromethode konstatierte ich einen durchschnittlichen Verlust von 10 Proz. Als Fällungsmittel wurden bei derselben jedoch außer Natriumchlorid, Bleiessig und Ammoniak, ferner Alaun angewandt. Im vorliegenden Vorschlag betreffs des Bestimmungsverfahrens der Acetonkörper des Urins wurde jedoch Alaun ausgeschlossen. Die adsorptive Einwirkung, die das bei der Fällung gebildete Aluminiumhydroxyd auf das vorhandene Aceton und die Acetessig-

säure bei der Bestimmung nach der Makromethode eventuell ausüben kann, fällt bei Anwendung der Mikromethode folglich fort.

Eine Frage, die ohne Zweifel näher beleuchtet zu werden verdient, ist der Grund zu dem vorgeschlagenen, vergleichsweise großen Zusatz von Chlornatrium.

Die Bedeutung, die die Anwesenheit von löslichen Elektrolyten für eine vollständige Ausfällung von Bleiglykosat besitzt, habe ich[1]) bei einer vorhergehenden Gelegenheit gezeigt. Stark zuckerhaltiger diabetischer Urin hat eine wesentlich niedrigere Konzentration von Mineralbestandteilen (NaCl) und wird nur unvollständig von ammoniakalischem Bleiessig gefällt. Wird dagegen ein solcher Urin mit einer normalen Menge Natriumchlorid versetzt, so wird die Ausfällung der Glykose vollständig. Hierbei werden auch die Chlorionen ausgefällt, und zwar so vollständig, daß bei der Destillation des Filtrats mit Chromatschwefelsäure irgendeine Bildung von freiem Chlor nicht wahrgenommen werden kann. Der Grund, warum ich auch im vorliegenden Vorschlag das Natriumchlorid als Fällungsmittel aufgenommen habe, ist somit ohne weiteres klar. Bei näherer Prüfung der vorgeschlagenen Menge finden wir, daß dieselbe im letztgenannten Falle etwa viermal größer ist. Die Versuche, die ich in ihren Einzelheiten hier nicht näher anführen will, haben nämlich gezeigt, daß die Ausfällung der Glykose durch Erhöhung des Natriumchloridgehaltes sowohl schneller verläuft als auch vollständiger wird. Bleiessig wird an und für sich nicht nur bei Zusatz von Chlornatrium, sondern auch beispielsweise von Nitraten unter Bildung von basischen Verbindungen gefällt. Ich wage es als wahrscheinlich anzusehen, daß diese Verbindungen entweder durch Adsorption oder rein chemisch zur Ausfällung der vorhandenen Glykose beitragen.

Versuche mit β-Oxybuttersäure.

Als Material bei diesen Versuchen wandte ich das Ca-Zn-Salz einer β-Oxybuttersäure an, das aus Urin hergestellt war. Der im vorhergehenden angegebene Vorschlag zur Bestimmung der β-Oxybuttersäure in kleinen Urinmengen ist im Anschluß an die in meinen Analyseprotokollen unter der Bezeichnung „Modifikation VII" ausgeführten Versuche ausgearbeitet. Es wurden nicht weniger als acht derartige Modifikationen geprüft. Mit Ausnahme der erstgenannten werden sie in ihren Einzelheiten nicht angeführt werden. Aus sämtlichen ging jedoch die Einwirkung auf die Acetonausbeute bei der Oxydation der β-Oxybuttersäure hervor, die auch kleine Variationen in der Versuchsanordnung zur Folge hat.

---

[1]) *Engfeldt*, Acta med. Scand. 52, 311, 1919.

Direkte Oxydationsversuche mit β-Oxybuttersäure.

Nach „Modifikation VII".

Eine gewisse Menge einer β-Oxybuttersäurelösung (das Ca-Zn-Salz) von bekannter Stärke wurde mit Wasser bis 60 ccm verdünnt, mit 5 Tropfen konzentrierter Essigsäure angesäuert, mit einer Spur Talk versetzt und ziemlich lebhaft 10 Minuten lang destilliert. Das Destillat wurde beseitigt, die Vorlage dieses Mal mit einer alkalischen Hypojoditlösung versetzt und an ihren Ort gebracht, wonach ich durch die Trichterröhre auf einmal 15 ccm Chromatschwefelsäuremischung zufließen ließ. Die Destillation wurde darauf 15 Minuten lang bei konstantem Niveau fortgesetzt, worauf der Jodverbrauch des Destillates nach der Ansäuerung mit H_2SO_4 durch Titrierung mit Thiosulfat bestimmt wurde. Betreffs der übrigen Einzelheiten bei der Destillation sowie der Stärke der Lösungen sei auf die Beschreibung der Methode hingewiesen.

Tabelle III.

Nr.	β-Oxybuttersäure zugesetzt mg	Jodverbrauch ccm n/100 J	β-Oxybuttersäure berechnet mg	Ausbeute Proz.
1	0,804	2,9	0,502	62,4
2	0,804	2,85	0,493	61,3
3	1,608	5,6	0,970	60,3
4	1,608	5,7	0,986	61,3
5	4,02	14,7	2,543	63,2
6	4,02	14,8	2,560	63,7
7	8,04	28,65	4,956	61,6
8	8,04	28,3	4,896	60,9

Die Ausbeute betrug durchschnittlich 61,8 Proz. (niedrigster Prozentsatz 60,3, höchster 63,7). Der Faktor für die Berechnung des β-Oxybuttersäuregehaltes ist folglich etwa 0,28, während derselbe theoretisch 0,173 beträgt. Die Destillation soll lebhaft und mit einer solchen Hastigkeit stattfinden, daß etwa 15 ccm in 10 Minuten überdestillieren. Bei Aufteilung des Destillates in Fraktionen mit 5 Minuten Destillationszeit zeigte es sich, daß der allergrößte Teil der β-Oxybuttersäure nach 10 Minuten zerfallen und der Zerfall nach 15 Minuten vollständig war. Die nach dieser Zeit erhaltenen Fraktionen waren in sämtlichen hier angeführten Fällen ganz frei von jodverbrauchenden Substanzen.

Versuche mit normalem, mit 5 Proz. Glykose versetztem Urin.

1 ccm Urin wurde mit 0,05 g Glykose versetzt und auf vorher angegebene Weise gefällt. 50 ccm Filtrat wurden zu 60 ccm verdünnt, angesäuert und destilliert.

Tabelle IV.

Nr.	1. Destillat ccm n/100 J	2. Destillat ccm n/100 J
1	0,05	0,25
2	0,05	0,35
3	0,10	0,25
4	0,05	0,30
5	0,05	0,25
6	0,05	0,40
7	0,05	0,25
8	0,05	0,30

Durchschnitt für die erste Destillation 0,05 ccm n/100 J, für die zweite Destillation 0,30 ccm mit höchstens 0,40 und wenigstens 0,25 ccm n/100 J.

Versuche mit normalem Urin ohne Zusatz von Glykose ergaben ähnliche Werte. Die Ausfällung der Glykose bei der Bleiessigbehandlung wird folglich so vollständig, daß die geringen Spuren, die möglicherweise zurückbleiben, keine meßbaren Mengen jodverbrauchender Substanzen bei der folgenden Oxydation verursachen. Bei Oxydationsversuchen mit reinen Glykoselösungen wurden jodverbrauchende Substanzen in Mengen gebildet, die in direktem Verhältnis zu dem beim Versuch vorhandenen Glykosegehalt stehen. Aus den angeführten Versuchen geht weiter hervor, daß bei der Bestimmung der Acetonkörper des Urins in dem ersten Destillat ein Jodverbrauch von 0,05 ccm n/100 und in dem zweiten ein solcher von etwa 0,3 ccm als normal anzusehen ist, indem er teils in geringerer Menge den physiologischen Gehalt des Urins an den genannten Körpern, teils und hauptsächlich andere flüchtige, bei der Destillation bzw. Oxydation gebildete jodverbrauchende Stoffe repräsentiert.

Versuche mit normalem, mit Glucose und wechselnden Mengen β-Oxybuttersäure (Ca-Zn-Salz) versetztem Urin.

1 ccm normalen Urins wurde mit 0,05 bzw. 0,01 g Glykose sowie mit wechselnden Mengen β-Oxybuttersäure (als Ca-Zn-Salz) versetzt, gefällt und filtriert. 50 ccm wurden mit 10 ccm Wasser verdünnt, angesäuert und 10 Minuten lang destilliert. Nach Auswechslung der mit alkalischer Hypojoditlösung versetzten Vorlage wurde die Chromatschwefelsäure auf einmal zugegeben, wonach die Destillation 15 Minuten lang bei konstantem Niveau fortgesetzt wurde. Der Jodverbrauch geht aus folgender Zusammenstellung hervor, in der der Jodverbrauch des normalen Urins abgezogen ist.

Tabelle V.

Nr.	β-Oxybuttersäure zugesetzt mg	Glykose zugesetzt mg	Jodverbrauch ccm n/100 J	β-Oxybuttersäure berechnet mg	Ausbeute Proz.
1	0,804	10	1,35 × 2	0,467	58,1
2	0,804	50	1,35 × 2	0,467	58,1
3	1,608	10	2,70 × 2	0,934	58,1
4	1,608	50	2,75 × 2	0,951	59,1
5	4,02	10	6,8 × 2	2,353	58,5
6	4,02	50	6,8 × 2	2,353	58.5
7	8,04	10	13,7 × 2	4,741	58,9
8	8,04	10	13,4 × 2	4,635	57,6
9	8,04	50	13,5 × 2	4,671	58,1
10	8,04	50	13,55 × 2	4,688	58,3
11	16,08	10	13,45 × 4	9,307	57,9
12	16,08	10	13,5 × 4	9,342	58,1
13	16,08	50	13,5 × 4	9,342	58,1
14	16.08	50	13,4 × 4	9,272	57,7

Die Ausbeute beträgt durchschnittlich 58,2 Proz. (niedrigster Wert 57,6 und höchster 59,1 Proz.). Der Faktor für die Berechnung des Oxybuttersäuregehaltes würde also, wenn man eine Mittelausbeute von 58,2 Proz. annimmt, 0,297 sein — eine Ziffer, die bei der praktischen Anwendung der Methode ohne Übelstand auf 0,3 abgerundet werden kann. Wie aus der Tabelle hervorgeht, zeigen die Ausbeuten eine völlig zufriedenstellende Übereinstimmung. Die Ausbeute ist ungefähr dieselbe, wie bei direkter Oxydation reiner β-Oxybuttersäure, auch wenn sie sich durchgehend einige Prozent niedriger hält. Daß die Adsorption bei der Fällung des Materials mit Bleiessig in irgendeinem Grade als ein hierzu beitragender Faktor angesehen werden kann, ist ganz wahrscheinlich, jedoch kann auf Grund des unbedeutenden Wechsels in den Ausbeuten auch bei bedeutenden Variationen in der Konzentration der vorhandenen β-Oxybuttersäure eine derartige Wirkung als sehr begrenzt angesehen werden — ein Verhalten, das, wie ich bereits im vorhergehenden zeigte, bei der nahe verwandten Acetessigsäure der Fall ist. Da die Adsorption folglich nicht als völlige Erklärung für die experimentell gefundene, zwar unbedeutende, aber doch tatsächlich vorhandene Verminderung der Acetonausbeute bei der Oxydation der β-Oxybuttersäure nach vorhergehender Fällung dienen kann, bleibt nur der Hinweis auf die in gewissen, nicht unbedeutenden Beziehungen ungleiche Zusammensetzung der Destillationsflüssigkeiten in den beiden Fällen übrig.

Autorenverzeichnis.

Adler, A. Über fluoreszierende Oxydationsprodukte des Bilirubins und deren Bedeutung als Fehlerquelle bei dem üblichen Urobilinnachweis. S. 64.

Asada, Kazuo. Der Fettstoffwechsel bei der Avitaminose. V. Mitteilung: Über die Verteilung der Fette und Lipoide in der Leber nach Phosphorvergiftung bei normalen, hungernden und avitaminösen Tieren. S. 203.

Auwers, K. v. und *O. Jordan.* Zur Kenntnis des Benzoyl-methyl-carbinols und des Phenyl-acetyl-carbinols. S. 31.

Behrendt, H. Über den Einfluß von Phosphat und Bicarbonat auf die Dissoziation des Kalkes im Liquor cerebrospinalis. S. 72.

Berczeller L. und *H. Wastl.* Über die Sedimentierung von Hefesuspensionen. S. 159.

— — Über Farbe und Dispersitätsgrad. II. S. 170.

Breitmann, Michael J. Über Kolloidkapillaren. Ein Beitrag zur Modelluntersuchungsmethode biologisch. Erscheinungen. S. 81.

Breitmann, Michael J. u. *N. N. Kusnetzoff.* Eine neue Methode der Bewertung der Geschwindigkeit und der Tiefe der Diffusion in Gallerten. S. 83.

Breitmann, Michael J. u. *N. P. Marasujeff.* Zur Frage über die Ring- und Schichtungsbildung bei der Diffusion in Gallerten. S. 85.

Brinkman, R. u. *A. v. Szent-Györgyi.* Studien über die physikalisch-chemischen Grundlagen der vitalen Permeabilität. IV. Mitteilung: Die Kapillaraktivität des Sauerstoffs und der Kohlensäure an der Grenzfläche Petroläther—Wasser. S. 47.

Cascão de Anciães, J. H. Über die Rolle der Adsorption bei der Bestimmung des Reststickstoffs. S. 179.

Davidsohn, Heinrich s. *Michaelis.*

Eichholtz, Fritz. Über die Resorption von Lecithin. S. 66.

— Über die Anwesenheit von Vitamin A in Handelslecithin. S. 70.

Engfeldt, N. O. Klinische Methode zur Bestimmung des Acetons und der β-Oxybuttersäure in kleinen Harnmengen. S. 556.

Eweyk, C. van s. *Rona.*

Fischer, Anton. Über den Kohlehydratstoffwechsel von Ascaris megalocephala. S. 224.

Fonseca, Fernando. Über die Bestimmung des inkoagulablen Stickstoffs (Reststickstoffs). S. 175.

Forrai, Elemér. Saccharophosphatase in menschlichen Organen. S. 149.

Hagihara, Jitsuichi. Über den Einfluß von Kolloiden auf Fermente. III. S. 482.

Hammarsten, Einar. Zur Kenntnis der biologischen Bedeutung der Nucleinsäureverbindungen. S. 383.

Händel, Marcel. Zur Frage der Acetonämie, insbesondere bei der Avitaminose. S. 258.

Hara, Saburo. Über den Vitamingehalt des Brotes. S. 52.

Hecht, Gerhard. Über den Kalkgehalt von Organen kalkbehandelter Katzen. IV. S. 270.

Heubner, Wolfgang. Die Wirkung von „Alkaloiden" auf die Permeabilität. S. 351.

Holló J. und *St. Weiss.* Einfache Methode zur direkten Bestimmung der Wasserstoffzahl des Blutes mittels Indikatoren. S. 87.

Hormaeche, Estenio. Studien zur Bestimmung der Abwehrfermente. S. 190.

Hsü, Tsou-Hia. Über die Adsorption des Trypsins durch Filtrierpapier. S. 303.

Jendrassik, L. Niveauregulator für Wasserdestillation. S. 285.

— Humorale Übertragbarkeit von Nervenreizen beim Warmblüter. S. 520.

Jordan, O. s. *Auwers.*

Jungmann, H. und *M. Samter.* Über den Kalkgehalt von Organen kalkbehandelter Katzen. III. S. 265.

Kahho, Hugo. Über die Einwirkung von Säuren auf die Hitzegerinnung des Pflanzenplasmas. V. S. 104.

Keeser, E. Adsorption und Arzneimittelverteilung i. Organismus. III. S. 536.

Kerb, Johannes. Das physiologische Verhalten der Glucosane. Vorläufige Mitteilung: Zur Kenntnis der Glucosane von Johannes Kerb und Elisabeth Kerb-Etzdorf. S. 60.

Kollmann, Gustav. Zur Kritik des üblichen Verfahrens zur Ermittlung des Purinbasengehaltes von Nahrungsmitteln. S. 219.

Kuroda, S. Über den Nachweis des Toluols in Organen und seine Verteilung im Organismus. S. 287.

Kusnetzoff, N. N. s. *Breitmann.*

Liebesny, Paul. Die spezifisch-dynamische Eiweißwirkung. S. 308.

Lorinser, Paul s. *Lüers.*

Lüers, Heinrich und *Paul Lorinser.* Über die Hitze- und Strahlungsinaktivierung der Malzamylase. S. 212.

Lüers, Heinrich und *Michael Siegert.* Zur Kenntnis der Proteine des Hafers. S. 467.

Maas, Johanna. Zur Kritik der mikrochemischen Fett- und Cholesterinbestimmung nach Ivar Bang. S. 379.

Marasujeff, N. P. s. *Breitmann.*

Maeda, Kiyomitsu. Über die Fermente im Fruchtwasser. S. 1.

Michaelis, Leonor u. *Heinrich Davidsohn.* Verfahren zur Reinigung von Toxinen, Fermenten und anderen biologisch wirksamen organischen Kolloiden. S. 294.

Moeller, W. Die Adsorption der Aminosäuren durch tierische Gewebe. S. 152.

Neuberg, C. Zur Frage der Konstitution des biochemisch gebildeten Oxy-oxo-propyl-benzols. S. 44.

Noguchi, J. Über Sulfatase. IV. Mitteilung: Über die enzymatische Spaltung der β-Naphthol-schwefelsäure. S. 138.

Orient, Julius. Über die Wirkung der Amine auf die Gärung. II. S. 353.

— Über die Wirkung der Oxymethylanthrachinon enthaltenden Drogen auf die Gärung. S. 361.

Pincussen Ludwig. Fermente und Licht. IV. Diastase III von Francesco di Renzo. S. 366.

— Fermente u. Licht. V. Diastase IV. S. 372.

Renzo, Franco di. Zur Kenntnis der Auxoureasen. S. 298.

Revoltella, Giovanni. Weiteres über die Herstellung des Ureasetrockenfermentes und über die Methodik der Harnstoffbestimmung in normalen und pathologischen Harnen. S. 229.

Riabouschinsky, N. P. s. *Smorodinzew.*

Rona, P., C. van Eweyk u. *M. Tennenbaum.* Über die Wirkung der Alkaloide aus der Atropin-, Cocain- und Morphingruppe auf die Hefe-Invertase. S. 490.

Rusznyák, Stefan. Bemerkungen über die Nephelometrie von Eiweißlösungen. S. 147.

Sabalitschka, Th. Über die Ernährung von Pflanzen mit Aldehyden. II. Polymerisation des Formaldehyds durch Phaseolus multiflorus und Pelargonium zu höheren Kohlehydraten von Th. Sabalitschka und H. Riesenberg. S. 545.

— Über die Ernährung von Pflanzen mit Aldehyden. III. Stört noch vorhandener Formaldehyd die Bestimmung von Zucker und Stärke nach Sabalitschka in den mit Formaldehyd behandelten Pflanzen? Von Th. Sabalitschka und H. Riesenberg. S. 551.

Samter, M. s. *Jungmann.*

Siegert, Michael s. *Lüers.*

Smorodinzew, J. A. und *N. P. Riabouschinsky.* Zur Frage nach dem Einfluß von Arsen- und Antimonverbindungen auf die fermentativen Funktionen des Organismus. II Mitteilung: Der Einfluß einiger Arsen- und Antimonpräparate auf das Pepsin. S. 26.

Stasiak, A. Cholesterin- und Bicarbonatgehalt des Blutes im Verlaufe experimenteller Nierenerkrankungen. S. 477.

Stern, Rudolf. Über den Mechanismus der serologischen Luesreaktionen. Zugleich ein Beitrag zur besseren Kennzeichnung der Eiweißfraktionen des menschlichen Blutserums. S. 115.

Suganuma. Die Wirkung der Collargolblockade der Leber auf den intermediären Stoffwechsel. S. 141.

Szent-Györgyi, A. v. s. *Brinkman.*

Takahashi, Y. Über das Vorkommen von Inulase in der Takadiastase. S. 199.

Tennenbaum, M. s. *Rona.*

Vestlin, K. Über Blut als Saponinreagens. S. 9.

Wastl, H. s. *Berczeller.*

Wha, Chienchi. Beitrag zum Verhalten von Calcium, Kalium, Chlor und Phosphor in der Milch und zur Technik der Ultrafiltration. S. 278.

Weiss, St. s. *Holló.*





